

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

DIPLOMOVÁ PRÁCE



KATEDRA FARMACEUTICKÉ TECHNOLOGIE
STUDIJNÍ OBOR: FARMACIE

Aplikační limity pro sublingvální podání léčiv 1

Application limits for sublingual drug administration 1

Vypracovala: Lenka Turnerová

Vedoucí práce: doc. RNDr. Pavel Doležal, CSc.

Hradec Králové, Květen 2011

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové dne

Děkuji vedoucímu práce doc. RNDr. Pavlu Doležalovi, CSc. za jeho podporu, rady a připomínky při vypracování této diplomové práce.

Také děkuji Mgr. Pavlu Berkovi a Mgr. Petru Vrbatovi za zpracování dat z ChemStation, Ing. Vladimíru Kubíčkoví, CSc. za pomoc při práci na luminiscenčním spektrofluorometru.

Za podporu, nejen v době psaní této práce, patří velké poděkování mé rodině.

OBSAH

| | |
|--|----|
| ABSTRAKT..... | 3 |
| ABSTRACT..... | 4 |
| 1 ÚVOD | 5 |
| 2 ZADÁNÍ PRÁCE..... | 6 |
| 3 TEORETICKÁ ČÁST | 7 |
| 3.1 Sublingvální podání léčiv | 7 |
| 3.1.1 Orální mukóza | 7 |
| 3.1.2 Mukus..... | 8 |
| 3.1.3 Slinné žlázy | 8 |
| 3.2 Fyziologické faktory sublingvální biodostupnosti | 9 |
| 3.2.1 Výhody sublingvální aplikace | 10 |
| 3.2.2 Nevýhody sublingvální aplikace | 10 |
| 3.2.3 Mechanismy sublingválního prostupu léčiv..... | 11 |
| 3.2.4 Zvyšování transmukozálního průniku léčiv | 13 |
| 3.2.5 Léčiva podávaná přes orální mukózu..... | 13 |
| 3.2.6 Biofarmaceutický klasifikační systém | 14 |
| 3.2.7 Orální filmy | 15 |
| 3.2.8 Dextransy | 16 |
| 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST..... | 19 |
| 4.1 Suroviny | 19 |
| 4.2 Přístroje..... | 19 |
| 4.3 Roztoky..... | 20 |
| 4.3.1 Příprava donorového roztoku kofeinu pro permeaci..... | 20 |
| 4.3.2 Příprava roztoků kofeinu pro kalibraci | 20 |
| 4.3.3 Příprava fosforečnanového pufru | 21 |
| 4.3.4 Příprava 1% roztoků dextranů | 22 |
| 4.3.5 Kalibrace roztoků dextranu | 22 |
| 4.4 Permeační pokus..... | 22 |
| 4.4.1 Příprava sublingvální membrány | 22 |
| 4.4.2 Permeační komůrka..... | 23 |
| 4.4.3 Permeační standardizace sublingvální membrány kofeinem | 23 |
| 4.4.4 Transmembránový in vitro sublingvální průnik dextranů..... | 24 |

| | | |
|-------|--|----|
| 4.4.5 | Protokoly z permeačních měření..... | 24 |
| 4.4.6 | Vysvětlení zkratk použitých v protokolech..... | 25 |
| 5 | DOKUMENTACE..... | 26 |
| 6 | VÝSLEDKY A DISKUZE | 60 |
| 6.1 | Kalibrační závislosti | 60 |
| 6.2 | Permeace kofeinu | 61 |
| 6.3 | Permeace dextranů..... | 61 |
| 7 | Závěr | 66 |
| 8 | LITERATURA..... | 67 |

ABSTRAKT

Práce v teoretické části přináší souhrn základních informací o sublingválním podání léčiv, popisuje základní fakta o medikovaných membránách k orální systémové aplikaci a o dextranech jako farmaceutických látkách.

Experimentální část je zaměřena na in vitro hodnocení transmukozální permeaci třech dextranů o rozdílné molekulové hmotnosti z vodného prostředí sublingvální membránou. K vyhodnocení integrity membrány využívá v prvním úseku permeačního pokusu jako markeru měření hodnot fluxů kofeinu. Akceptorovou fází byl vždy fosfátový pufr o pH 7,4. Stanovení kofeinu bylo provedeno pomocí HPLC, stanovení dextranů spektrofotometricky.

Průměrná hodnota fluxů kofeinu činila $J = 1370 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$ při směrodatné odchylce $\text{SEM} = 100,8$ ($n = 17$).

Testování permeability sublingvální membrány přineslo průkaz průchodu fluorescenčně značených dextranů. Překvapivým je zjištění o pomalejší permeaci dextranu o molekulové hmotnosti 4 000 ($J = 28,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$; $\text{SEM} = 21,4$) ve srovnání s dextranem 20 000 ($J = 42,0 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$; $\text{SEM} = 11,8$).

ABSTRACT

The theoretical part of thesis provides basic information about the sublingually administered drugs, describes the primary facts of the medicated membranes for oral systemic administration and about dextrans as the pharmaceutical substances.

The experiment focuses on transmucosal in vitro evaluation of permeation of the dextrans of three different molecular weights from aqueous environment throughout sublingual membrane. The measurements of fluxes of caffeine as a marker at the opening period of permeation experiments were performed. An acceptor phase was always the phosphate buffer, pH 7.4. Determination of caffeine was performed by HPLC, the dextrans were determined spectrofluorimetrically.

The average flux of caffeine is $J = 1370 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$, SEM = 100,8 (n = 17).

The proof of the transmembrane passage of all the mentioned fluorescent-labelled dextrans was given.

Surprisingly, the lower permeation rates of dextran 4000 ($J = 28,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$; SEM = 21,4) comparing with dextran 20 000 ($J = 42,0 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$; SEM = 11,8) were found.

1 ÚVOD

Orální transmukozální a zejména sublingvální podání léčiv je alternativní metodou pro systémové podání léčiv. Oproti perorální aplikaci poskytuje některé výhody. Díky vysoce prokrvené mukóze umožňuje vysokou biodostupnost a zajišťuje přímý transport léčiva do krevního oběhu. Přitom se vyhýbá účinkům žaludečních a střevních šťáv a vlivu first-pass metabolismu.

Každé léčivo nelze podávat sublingválně. Hlavním omezujícím faktorem je velikost molekuly léčiva a její ionizace, na straně druhé potom charakter mukózy a sublingvální membrány jako celku. U mnoha léčiv byl transmukozální prostup již zkoumán a je zřejmé, že jej bude možné využít jen u relativně malé části z nich. Podstatné je, že pro řadu léčiv přináší možnost zajištění rychlého nástupu účinku a systémového podání terapeuticky významných peptidů a proteinů.

Výzkum podání léčiv přes sublingvální membránu in vitro probíhá na UK-FAF v Hradci Králové čtvrtým rokem a předkládaná diplomová práce je jeho součástí.

2 ZADÁNÍ PRÁCE

1. V teoretické části podat kontextový přehled o sublingvální aplikační cestě pro podání léčiv a využití sublingválních membránových filmů. Ve spojitosti s navazujícím experimentem charakterizovat farmaceuticky používané dextrany.

2. V experimentální části:

2.1 Proměřit in vitro hodnoty fluxu kofeinu jako permeačního markeru pro průnik látek sublingvální membránou

2.2 Proměřit in vitro hodnoty fluxu tří dextranů s odstupňovanou molekulovou hmotností jako modelových výše molekulárních sublingválních permeantů

Díličmi úkoly experimentu jsou:

- a. zvládnutí ex vivo přípravy sublingválních membrán z prasete domácího pro permeační pokusy in vitro
- b. příprava kalibračních vzorků a donorových vzorků kofeinu a dextranů ve vodné fázi
- c. zvládnutí HPLC metodiky stanovení kofeinu v akceptorové fázi z permeací
- d. osvojení fluorescenčního spektrometrického stanovení v akceptorové fázi z permeací
- e. realizace permeačních pokusů na cca 15 permeačních komůrkách včetně navazujícího stanovení permeantů
- f. kompletní výpočty hodnot fluxů kofeinu a zadaných dextranů
- g. souhrnné vyhodnocení pokusů s formulací předběžných závěrů

Předpokládá se vypracování Experimentální části v přímé spolupráci s paralelně probíhající další diplomovou prací Lucie Krupauerové s následnou samostatnou prezentací pouze vlastních podkladů a výsledků.

3. Hlavní cíle práce

3.1 Precizace metodiky preparace sublingválních membrán

3.2 Ověření integrity biologických membrán nízkomolekulárním permeantem

3.3 Orientační vyhodnocení in vitro permeability dextranů sublingvální membránou na základě změření a vyčíslení hodnot příslušných fluxů

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Sublingvální podání léčiv

Sublingvální transmukozální prostup léčiv je dnes novou strategií při volbě podání léčiv. Ačkoli má svoje omezení, je možné očekávat, že v budoucnosti budou nová léčiva projektována i tak, že se bude počítat s jejich sublingválním podáním. Současná věda a výzkum se na tento způsob podání léčiv zaměřuje.^{1, 2}

Léčivo se může vstřebat z dutiny ústní hned z několika oblastí. Existuje bukální podání léčiva, přes tvrdé patro a dásně, nejlépe využitelným způsobem je zřejmě sublingvální cesta a to především díky vysokému prokrvení, tenkosti membrány a významnému povrchu membrány. Celková plocha membrány v ústní dutině činí 170 cm², z čehož přibližně 50 cm² tvoří nekeratinizovaná tkáň. Každý druh mukózy má jiné vlastnosti, které pak ovlivňují vstřebání léčiv.^{3,4}

3.1.1 Orální mukóza

Orální mukóza se skládá ze tří hlavních vrstev, epitelu, lamina propria a submukózy. **Epitel** je vrstevnatý, šupinatý a může být keratinizovaný nebo nekeratinizovaný. Hlavní funkcí epitelu v dutině ústní je chránit spodní tkáň proti potenciálním škodlivým faktorům.

Keratinizovaný epitel je mechanicky pevný a chemicky odolný. Nalezneme jej např.: na tvrdém patru, dásni a obecně řečeno v neflexibilních oblastech orální dutiny. Keratinizovaná vrstva epitelu je tvořená neutrálními lipidy jako ceramidy a acylceramidy, které jsou spojovány s bariérovou funkcí. Tento epitel neumožňuje permeabilitu vody.

Nekeratinizovaný epitel je relativně flexibilní. Nalezneme jej např. u sublingvální a bukální membrány, měkkého patra, tváří a rtů. Neobsahuje acylceramidy a obsahuje jen malé množství ceramidů. Vyskytuje se zde malé množství neutrálních a polárních ceramidů, hlavně cholesterol sulfáty a glukosylceramidy. Tento epitel pak umožňuje větší permeabilitu pro vodu, místa, kde dochází k prostupu léčiv, jsou především nekeratinizovaná.

Epitel je oddělený bazální membránou od lamina propria.

Bazální membrána je mechanickou oporou epitelu. Nové buňky vznikají mitózou v bazální vrstvě a nově vznikající buňky tlačí staré buňky směrem k povrchu. Buňky mění své vlastnosti, zvětšují se, stávají se více plochými. Přes kubický a polygonální tvar se přeměňují na buňky ploché. V buňkách se zvyšuje množství proteinů, stávají se méně vitálními a chybí zde organely. Proces stárnutí a tvorby odumřelé vrstvy buněk trvá 13 dní.¹

3.1.2 Mukus

Buňky epitelu v dutině ústní jsou obklopeny mukusem, který je tvořen především proteiny a sacharidy. Mukus je jedním z důležitých faktorů, které ovlivňují bioadhezi mukoadhezivních lékových forem. Má vlastnosti protektivní, lubrikující a vyskytuje se v něm také řada protektivních molekul, např. imunoglobuliny. Mukus je produkován speciálními pohárkovými buňkami, je sekretován velkými i malými slinnými žlázami jako část slin. Ačkoli se jedná z 95 až 99 procent o vodný roztok, klíčovými makromolekulami, jsou zde glykoproteiny označované jako mucin. Jejich molekulová hmotnost činí od 500 do 20 000. Díky kyselině sialové a sulfátovým zbytkům má mukózní síť při fyziologickém pH negativní náboj.

Mukus při fyziologickém pH tvoří silný kohezivní gel, který se váže na povrch epiteliálních buněk a vytváří zde gelovou vrstvu. Tato vrstva hraje důležitou roli, neboť prodlužuje kontaktní čas léčiva s orální membránou.^{1,2,3}

Lamina propria je tou částí orální mukózy, která zprostředkuje sublingvální podání léčiv, neboť právě sem zasahují kapiláry a cévy a také nervová vlákna. Jedná se o souvislou pojivovou tkáň, která je tvořena z kolagenu a elastických vláken. Právě tato část zajišťuje mechanické vlastnosti orální mukózy.

3.1.3 Slinné žlázy

V orální dutině nalezneme 3 druhy slinných žláz:

- Příušní – produkují řídký, vodnatý sekret bohatý na enzymy a protilátky
- Podjazykové – vytvářejí viskózní, mukózní sekret s velmi malou enzymatickou aktivitou
- Podčelistní – se vyznačují tvorbou obou druhů sekretů

Mnoho dalších miniaturních žláz je roztroušeno po celé orální mukóze.

Sliny jsou hypotonické vodní sekrety, které obsahují množství hlenu, enzymů, protilátek a anorganických iontů. Sliny plní úlohu protektivní kapaliny pro všechny tkáně dutiny ústní. Chrání měkké tkáně před abrazí a oděrkami, které mohou být způsobeny tvrdým materiálem, a také před chemikáliemi. Umožňují neustálou mineralizaci zubní skloviny a popřípadě pomáhají demineralizaci skloviny při obtížích a zubních kazech. Sliny zvlhčují a lubrikují potravu, usnadňují její polykání. Sliny jsou 1% vodným roztokem organických a anorganických solí. Složení slin závisí na 3 faktorech: denní doba, typ stimulu a stupeň stimulace. Hodnota pH slin se pohybuje v rozmezí 5,5 až 7. Hodnota pH se zvyšuje v závislosti na množství sodíku a karbonátu, s jejich zvyšujícím se množstvím stoupá hodnota pH.^{5,6} Denně se vytvoří 0,5 až 2 litry slin. Právě toto množství musí hydratovat pevné lékové formy. Sliny vytváří v dutině ústní hydrofilní prostředí, což je hlavní důvod, proč se jako pojiv u orálních pevných lékových forem využívají hydrofilní polymery.^{2,7,8}

Množství slin umožňuje rozpouštění a může tedy zvýšit i biodostupnost. Sliny vedle tohoto pozitivního vlivu mohou biodostupnost ovlivnit i negativně:

- léčivo může být zředěno příliš, může dojít k příliš rychlému rozpouštění a absorpci
- existující interindividuální rozdíly mezi pacienty mohou způsobit různý rozsah absorpce
- pacient může spolknout sliny s rozpuštěným léčivem nedopatřením
- neobsahují proteázy, ale obsahují esterázy, karbohydrázy a fosfatázy.

3.2 Fyziologické faktory sublingvální biodostupnosti

Permeabilita epitelu v prostoru mezi buňkami v nejsvrchnější části epitelu je nejvyšší. Směrem k plochým, kompaktním buňkám v nižších vrstvách je transport látek výrazně ztížen. Také intercelulární lipidy hrají důležitou roli. Po jejich extrakci se zvyšuje permeabilita tkáně. Nekeratinizovaná mukóza je více propustná než keratinizovaná, sublingvální mukóza je permeabilnější než bukalní.¹

V orální mukóze se vyskytují intercelulární tělíska nazývané membrane coating granules, MCGs. Jedná se o kulaté či oválné organely o velikosti 100 nm až 300 nm. Vyskytují se v keratinizovaném i nekeratinizovaném epitelu, snížená permeabilita

mukózy je přičítána právě těmto MCGs.⁹ Během studií, při kterých byly tyto MCGs z epitelu odstraněny, se zjistilo, že permeabilita orální mukózy se zvýšila i pro látky, které dříve přes membránu prostoupit nemohly.¹⁰

Tloušťka epitelu sublingvální mukózy (100 až 200 mikrometrů) je menší než bukální (500 až 800 mikrometrů). To zajišťuje extrémně rychlou absorpci.¹ V některých případech však může být silnější bukální membrána výhodou, zejména tehdy, je-li rychlý nástup účinku nežádoucí.¹¹

Krevní zásobení a lymfatický systém v lamina propria zajišťuje rychlou absorpci do systémového řečiště.¹

Metabolická aktivita samotné orální mukózy je velmi nízká. Přestože obsahuje např. peptidázy a esterázy je tato cesta vhodná pro enzymaticky labilní látky.¹ Léčivo, které se absorbuje v dutině ústní, se dostává přímo do krve, obchází first-pass metabolismus v játrech, čehož lze využít práv u látek enzymaticky labilních, např. peptidů a proteinů.

3.2.1 Výhody sublingvální aplikace

- relativně velká plocha až 100 cm² pro absorpci (i s bukální sliznicí)
- přístupnost a s ní spojená jednoduchost užití sprejů, tablet, zvýšený komfort pro pacienty (například oproti čípkům či pesarům)
- dobrá compliance
- malé ovlivnění absorpce přítomností potravou, výkyvy pH způsobují jen sliny
- bohatá krevní zásoba zajistí rychlou absorpci a rychlý začátek akce
- nízká metabolická aktivita, která je důležitá pro látky enzymaticky nestabilní
- obejitím first-pass metabolismu v játrech se dosáhne vyšší systémové koncentrace léčiva
- použitelnost v situacích, kdy pacient trpí gastrointestinálními problémy znesnadňujícími perorální aplikaci: nauzea, zvracení, problémy s polykáním¹

3.2.2 Nevýhody sublingvální aplikace

- nevhodnost pro látky s vysokou molekulovou hmotností
- lokální dráždění a citlivost mukózy (relativně málo časté)
- jistá metabolická aktivita vůči peptidům a proteinům (je nutné s ní počítat)

- sliny smáčející mukózu mohou snižovat rozsah absorpce - lze tomu předejít použitím mukoadhezivních systémů
- difúze může být omezena mukózou, včetně nespecifických vazeb aktivní látky

3.2.3 Mechanismy sublingválního prostupu léčiv

Léčivá látka se musí z lékové formy nejprve uvolnit a dostat se na místo vlastní absorpce, tedy k sublingvální membráně, poté musí difundovat přes lipofilní buněčnou membránu, projít všemi vrstvami orální mukózy, případně projít přes hydrofilní vnitřní prostředí buňky než dosáhne systémové cirkulace. Orální mukóza obsahuje jak hydrofilní, tak i hydrofobní bariéry, kterými musí léčivo projít.¹²

Prostup léčiv přes mukózu je ulehčen díky absenci stratum corneum (je největší bariérou při absorpci přes kůži). Díky tomu je bukalní permeabilita 4 až 4000krát větší než kožní.¹³ Množství látky, které se absorbuje, je závislé na mnoha parametrech: koncentrace léčivé látky, pojivo, doba kontaktu lékové formy s mukózou, odvod krve z tkáně, stupeň ionizace léčiva a pH v místě absorpce, velikost molekuly, lipofilita.²

Existuje několik mechanismů penetrace a permeace: pasivní difúze (paracelulární a transcelulární), přenašečový, aktivní transport, pinocytóza, endocytoza.

Paracelulární cesta

Jedná se transport charakterizovaný putováním léčiva kolem nebo mezi buňkami. V prostoru mezi buňkami nalézáme hydrofilní prostředí, což znamená, že tato cesta není vhodná pro lipofilní léčiva. Dále mezi buňkami existuje spojení typu tight junction (nebo velmi podobné). Právě tato spojení jsou hlavní bariérou paracelulárního transportu pro makromolekuly a polární sloučeniny. Tight junctions a permeabilita mohou být regulovány řadou fyzikálně chemických faktorů, např. koncentrace cAMP a intracelulárního vápníku. Zlepšení absorpce hydrofilních látek pomocí cyklodextrinů může být způsobeno dočasným otevřením tight junctions.

Transmukozální permeace pomocí paracelulární cesty je často jediná možnost penetrace polárních molekul.²

Transcelulární cesta

Tato cesta představuje vstup léčiva přes jednu buňku k další, dokud nedosáhne systémové cirkulace. Tento způsob obnáší vstup přes lipofilní membrány, z čehož

můžeme usoudit, že tuto cestu budou preferovat lipofilní molekuly. Limitujícími faktory transcelulární cesty jsou výskyt vodných kanálů, pórů a velikost membrán.^{2,3}

Léčivo může dosáhnout systémové cirkulace většinou oběma cestami, ale je pravděpodobné, že zvolí tu cestu, která bude odpovídat jeho fyzikálně chemickým vlastnostem.³ Zda se léčivo bude permeovat paracelulární nebo transcelulární cestou závisí na celkové konfiguraci molekuly, lipofilitě a náboji.

Přenašečový transport – speciální transportní mechanismy

I v sublingvální membráně existuje transportní systém pomocí přenašečů, které umožňují transport, ale pouze u malých molekul jako monosacharidů či aminokyselin. Přesné informace o umístění, kapacitě a specifičnosti přenašečů nemáme. Víme, že existuje transportní systém pro Na⁺/ D-glukózu.^{3,14}

Endocytóza

Tento způsob prostupu léčiv zatím není pořádně prostudován, předpokládá se, že jeho význam vzrůstá u vysokomolekulárních látek.³

Pasivní difúze je primárním mechanismem penetrace a permeace léčiv, kdežto penetrace zprostředkovaná přenašeči hraje pouze malou roli. Tohoto principu využívá glukóza, monokarboxylové kyseliny, salicylová kyselina a nikotinová kyselina.

K popisu penetrace léčiva můžeme využít první Fickův zákon. Pro zjednodušení si mukózu představujeme jako hydrofobní membránu. Difúzní koeficient, rozdělovací koeficient, tloušťka membrány základními parametry, další jsou plocha, délka uvolňování a koncentrace jsou závislé na lékové formě.

Faktorem, který limituje absorpci léčiva, je ta skutečnost, je-li léčivá látka vázaná nebo difunduje jako volná. Pokud je léčivá látka vázaná, potom se její biodostupnost rapidně snižuje, a transmukozální cesta podání pak pro ni není vhodná.

Lipofilní léčiva mají vyšší permeabilní koeficient než hydrofilní léčiva, samozřejmě v důsledku vlastností membrány, neplatí to však vždy. Pokud je zároveň vysoká i lipofilita, nemusí být absorpce vysoká ani pro lipofilní léčiva. Musí existovat vhodná rovnováha mezi rozdělovacím koeficientem a rozpustností léčiva. Množství léčiva, které může projít přes membránu, se udává pouze na miligramech.²

3.2.4 Zvyšování transmukozálního průniku léčiv

Enhancery se podílejí na zlepšení permeability především hydrofilních léčiv. Mechanismus jejich účinku není přesně znám. Předpokládá se, vytvoří vodní póry na povrchu buňky, čímž se zvýší permeabilita hydrofilních léčiv. Případně usnadňují průnik léčiva tím, že zvyšují membránovou fluiditu. Mohou ovšem způsobit lokální iritaci tkáně, dlouhodobou toxicitu nebo umožnit průnik patogenním mikroorganismům. Účinnost enhanceru závisí na fyzikálně chemických vlastnostech léčiv, funkční ploše a vlastnostech pojiva.

Chemické enhancery se podílejí na zvýšení penetrace různými mechanismy, např. snižuje viskozitu anebo elasticitu mukózní vrstvy, provádí změny v lipidové dvojvrstvě, obchází enzymatické bariéry nebo zvyšuje termodynamickou aktivitu permeantu. Jako permeační enhancer se užívají chelátory (EDTA Na^+), surfaktanty, žlučové kyseliny, mastné kyseliny, nesurfaktanty.

Mohou být použity samotné nebo v kombinaci, zvyšují permeaci, ale nepoškozují ani neiritují mukózu.

Elektroenhancery pracují na bázi elektroforetického, elektroosmotického a elektroporačního principu na základě působení elektrického pole. Jsou výhodné pro ve vodě rozpustné a iontové sloučeniny. Migrace je limitována maximálním elektrickým proudem, který může být aplikovaný na membránu. Je to obvykle proud $0,5\text{mA/cm}^2$, který může být aplikován na membránu bez vedlejších účinků.

Když je na tkáň aplikováno elektrické pole, dochází k síťovému pohybu vody, migraci solvatovaných iontů a procesu zvanému elektroosmóza.

K dočasnému snížení hustoty lipidů v membráně dochází díky působení mikrochemickému, tepelnému a kavitačnímu.^{2,15}

3.2.5 Léčiva podávaná přes orální mukózu

Sublingválně se aplikuje například nitroglycerin, dinitrát isosorbidu, buprenorfin a nifedipin.¹⁶

Bukálně se nejčastěji podávají prochlorperazin, lamotrigin¹⁷, salotalol¹⁸, nikotin¹⁹, fentanyl citrát²⁰, metronidazol, doxycyklin, galanthamin²¹ a peptidy.

Přes mukózu dásně se podávají buprenorfin a melatonin.

Mukóza měkkého patra se využívá pro aplikaci amikacinu a gentamycin.³

Současný vývoj se zaměřuje na podání estrogenů a testosteronu sublinguální cestou. Estrogen u menopauzálních žen s kardiovaskulárním onemocněním zajistil periferní a koronární vazodilataci, redukci vaskulárního odporu a zlepšení endoteliální funkce. Velké naděje se vkládají na vývoj sublingválního podání u kaptoprilu, verapamilu, propafenonu a terapeutických kanabinoidů, z vysokomolekulárních například inzulinu a vakcín.

3.2.6 Biofarmaceutický klasifikační systém

Léčivé látky lze z hlediska fyzikálně chemického rozdělit na základě jejich rozpustnosti. Z farmakologického hlediska je toto členění použitelné jen omezeně, neboť nezohledňuje terapeutickou dávku. Některé látky se k vyvolání terapeutického efektu podávají jen v malých množstvích (např. některé hormony), zatímco u jiných je větší dávka nezbytná (např. antibiotika). Může se stát, že malé množství látky těžce rozpustné látky v trávicím traktu se zcela vstřebá a vyvolá potřebnou odezvu, zatímco větší množství relativně lépe rozpustné látky již nikoliv. Proto samotná rozpustnost není dostatečným měřítkem pro posouzení biodostupnosti léčiv. V polovině devadesátých let byl proto navržen biofarmaceutický klasifikační systém (BCS), který rozděluje léčiva podle jejich rozpustnosti a intestinální permeability do čtyř tříd.

Tab. 3.1: Charakterizace tříd BCS

| Třída | Solubilita | Permeabilita | Léčiva |
|-------|------------|--------------|-----------------------------------|
| 1. | Vysoká | Vysoká | verapamil, amilorid |
| 2. | Nízká | Vysoká | fenytoin, karbamazepin |
| 3. | Vysoká | Nízká | acyklovir, furosemid |
| 4. | Nízká | Nízká | hydrochlorothiazid, amfotericin B |

Léčivo je považováno za vysoce rozpustné, pokud se jeho nejvyšší léčebná dávka rozpustí ve 250 ml vodného pufru (pH 1 až 7,5) a vysoce vstřebatelné je tehdy, pokud se vstřebá nejméně z 90 procent. Uvedená kritéria prošla následně ještě řadou úprav regulačními institucemi. Pro empirické posouzení vstřebatelnosti léčivé látky navrhl Lipinsky „pravidlo tří pětik“. Léčivá látka, jejíž molekulová hmotnost je větší než 500, dekadický logaritmus rozdělovacího koeficientu v systému oktanol/voda je větší než

5 a molekula má 5 a více vodíkových donorů, bývá zpravidla těžce vstřebatelná. Zejména u léčiv skupiny 4 je pak pro dosažení vhodné biologické dostupnosti potřebné jejich rozpustnost zvýšit.

Hlavním cílem uplatnění BCS je zajistit vyšší efektivnost vývoje léčiv. Jeho znalost může výrazně přispět k vývoji lékové formy nebo cesty podání. Dosavadní poznatky jsou založeny na experimentálních datech. Dovolí určit potenciál pro vzájemný vztah in vitro a in vivo, takže může výrazně snížit nároky na provádění in vivo testů.

Musí být zvažován způsob uvolňování léčivé látky z léčivého přípravku. Především u málo rozpustných léčiv existuje mnoho limitujících okolností:

- Málo rozpustná léčiva mohou být limitována objemem šťáv v GIT a pH
- Žlučové kyseliny a jejich soli zvyšují rozpustnost lipofilních látek
- Přítomnost jídla může mít na rozpustnost a absorpci léčiva další vliv
- Rychlost vyprazdňování žaludku a doba prostupu léčiva GIT
- Množství léčivé látky je často sníženo hydrolýzou, metabolickými procesy, enzymy anebo bakteriemi

Ve farmacii se využívá znalostí BCS pro založení in vivo a in vitro studií. Od doby zavedení BCS do praxe se vědecké přístupy ke stanovení bioekvivalence změnily. Směřují navíc k tomu, aby bylo možné omezit pokusy na lidských dobrovolnících a tím mohla klesnout cena generik, což by ročně ušetřilo miliony dolarů.^{22,23}

Sublingvální systémová aplikace má značný potenciál využití zejména pro léčiva, která jsou zařazena do 4. třídy BCS.

3.2.7 Orální filmy

Orální filmy jsou novějšími lékovými formami, u nichž můžeme ocenit především jejich flexibilitu, výbornou adhezi a pohodlnost aplikace pro pacienta. Velkou výhodou je u nich rychlý nástup účinku, trvalé uvolňování léčiva a rychlý pokles sérové koncentrace léčiva, když je film odstraněn. Vyrábí se odléváním roztoku polymeru s léčivem a pomocnými látkami, např. plastifikátorem na ploché povrchy a následně se suší. Nejčastější velikost je 3 až 5 cm², pro pacienta komfortní tvar je eliptický.³ Vyskytují se tři typy orálních filmů: orální filmy s rozpustným matrixem, s nerozpustnou zadní stěnou a rozpustnou zadní stěnou.^{24,25}

Orální filmy s rozpustnou maticí jsou určeny pro uvolňování léčiva do dutiny ústní. Působí podobně a mají i stejné nevýhody jako jiné pevné lékové formy. Mukoadhezivní stěna přípravku prodlužuje setrvání matrice v dutině ústní. To zajišťuje dlouhotrvající uvolňování léčiva, s tím související nástup účinku, mohou potenciálně umožnit podání většího množství léčivé látky. Tato forma je velmi vhodná i pro léčení lokálních onemocnění, např. kandidóz.

Orální filmy s nerozpustnou zadní stěnou jsou určeny pro systémové podání léčiv. Chovají se jako systém uzavřený, chráněný od okolí, především od slin. Množství léčiva, které se uvolňuje, je řízené a zaručuje konstantní uvolňování po dobu 10 až 15 hodin. Nevýhodou je možnost využití malého prostoru mukózy a nutnost odstranit po uvolnění léčiva film z úst.

Orální filmy s rozpustnou zadní stěnou lze ve srovnání s předchozími užít jen na kratší dobu. Snadno se aplikují a v porovnání s filmy představují levnější formu s nerozpustnou zadní stěnou.

3.2.8 Dextrany

Dextrany jsou polymery glukosy, které jsou již více než padesát let používány jako plamaexpandery, k podpoře periferní cirkulace a jako antitrombotické agens. Dnes se postupně objevuje jejich nové potenciální využití jako nosiče makromolekul, především léčiv, a to včetně proteinů. Lze jimi prodloužit terapeutický efekt léčiva, neboť vytvořením konjugátu dextran-léčivo se zvyšuje biologický poločas. Také je možné jimi zajistit pasivní, případně aktivní targeting. Zajímavá je tvorba konjugátu dextran-proléčivo. V tomto případě dochází k uvolnění aktivního léčiva až v in vivo podmínkách.

V této diplomové práci jsou dextrany využity k orientačnímu vymezení možností jejich pasáže sublingvální membránou.

Dextrany vznikají činností bakterií ze sacharózy, nebo chemickou syntézou. Strukturálně se jedná o lineární α - 1,6 – glykosidickou vazbou spojené monomery s různým stupněm větvení přes 1,2 a 1,3 a 1,4 vazby. Stupeň větvení se liší podle způsobu vzniku dextranu, může se pohybovat v rozmezí 0,5 až 60 procent a ovlivňuje molekulovou hmotnost. Obě tyto vlastnosti dále mají vliv na fyzikálně-chemické vlastnosti, např. rozpustnost ve vodě, která se zvyšujícím se stupněm větvení se snižuje. Dextran se stupněm větvení vyšším než 43 procent je již považován za ve vodě nerozpustný. Dextrany jsou stabilní v mírně kyselém nebo bazickém prostředí.

Další důležitou vlastností je polydisperzita. Přírodní dextrany se vyznačují vysokým stupněm polydisperzity. Narazíme-li na dextrany o nízkém stupni polydisperzity, potom se jedná především o dextrany, které vznikly parciální depolymerizací. Pro vědecké účely se používají dextrany o molekulové hmotnosti 4 až 200 tisíc a stupněm polydisperzity 1,5. V klinické praxi nalezneme dextrany o molekulové hmotnosti 40 tisíc nebo 70 tisíc.

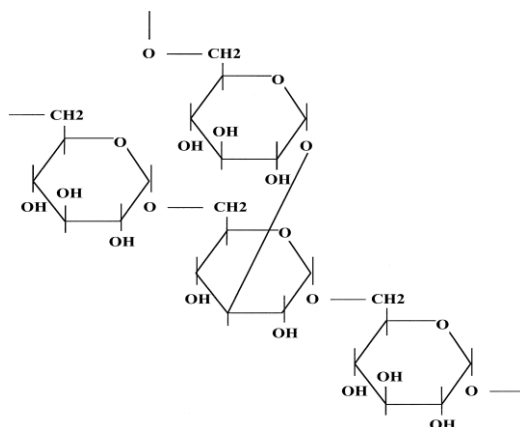
Biodostupnost dextranů po perorálním podání je zanedbatelná, což je dáno především jejich velikostí, která nedovolí prostup přes epiteliální spoje nebo vodní póry v gastrointestinálním traktu. Dextrany tedy nemohou být pro systémové podání polymeru s léčivou perorálně použity. Bylo zjištěno, že dextrany jsou degradovány na menší štěpy schopné receptorově zprostředkované absorpce při permeaci přes epiteliální buňky v gastrointestinálním traktu.

Dextrany o různé molekulární velikosti frakcí jsou eliminovány různou rychlostí, např. dextrany s vyšší molekulovou hmotností setrvávají v plasmě delší dobu. Kinetika léčiv navázaných na dextran závisí na kinetice rozkladu vazby na kostru polymeru. Dextrany se depolymerizují α -1-glukosidázami (dextranázami) především v játrech, slezině, ledvinách a z malé části v gastrointestinálním traktu. Slezina a játra mají největší koncentraci dextranázy. V játrech probíhají dvě cesty eliminace, a to depolymerizace dextranázami a exkrece žlučí. Obě tyto cesty jsou pomalé.

Nízkomolekulární dextrany se vylučují močí. Se zvyšováním molekulové hmotnosti dextranů jejich renální clearance klesá. Kinetika renální exkrece je vesměs lineární. Pomalejší eliminace anionických dextranů je dána negativním nábojem na membránách, který zadržuje průchod molekul.

Dextrany vstupují do buněk pasivním způsobem, endocytózou. Obsahují velké množství hydroxylových skupin, které lze užít ke konjugaci. Mají-li léčiva karboxylovou funkci, reagují s hydroxylovou skupinou za vzniku esterové vazby, např. nesteroidní protizánětlivá léčiva naproxen, ibuprofen, diclofenak. Máme-li léčiva, která neobsahují karboxylovou funkci, pak se musí dextran před konjugací sám aktivovat, např. oxidací, halogenací, fosgenovou aktivací.^{26,27,28}

Obr. 3.1 Struktura dextranů²⁷



4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Suroviny

| | |
|---|-----------------------------------|
| Kofein (ČL 2005) | Dr. Kulich Pharma, Hradec Králové |
| Fluorescein isothiokyanát-dextran FD4 | Sigma-Aldrich, Praha |
| Fluorescein isothiokyanát-dextran FD20S | Sigma-Aldrich, Praha |
| Fluorescein isothiokyanát-dextran FD40S | Sigma-Aldrich, Praha |
| Methanol pro HPLC | Sigma-Aldrich, Praha |
| Kyselina mravenčí (p.a.) | Penta, Praha |
| Dihydrogenfosforečnan sodný (ČL 2005) | Dr. Kulich Pharma, Hradec Králové |
| Hydrogenfosforečnan sodný (ČL 2005) | Dr. Kulich Pharma, Hradec Králové |
| Azid sodný (p.a.) | Chemapol, Praha |
| Chlorid sodný (ČL 2005) | Penta, Praha |
| Voda na injekci (ČL 2005) | Ardeapharma, Ševětín |
| Čištěná voda (ČL 2005) | UK-FAF, Hradec Králové |
| Voda pro HPLC ultračistá | UK-FAF, Hradec Králové |

Všechny suroviny byly podle deklarací výrobců a dodavatelů kvality lékopisné nebo vyšší. Čištěná voda a voda pro HPLC pochází z centrální přípravy na UK-FaF a nebyla podrobena lékopisným zkouškám.

4.2 Přístroje

| | |
|----------------------------------|-----------------------------------|
| Analytické váhy Sartorius 2004MP | Sartorius GmbH, Německo |
| Analytické váhy Kern 440-45N | Kern Sohn GmbH, Německo |
| Digitální pH metr Gryf 209 L | Gryf HB s.r.o., Česká republika |
| Elektronická míchačka Variomag | Labortechnik, Německo |
| Vodní lázeň, Grant JB5 | Grant Instruments, Velká Británie |
| Termostat BT50 | Labor. přístroje, Česká republika |
| Magnetické míchadlo, Telesystem | H-P Labortechnik, Německo |
| Sestava HPLC Agilent Techn.1200, | Agilent Technologies, USA |

- Isokratické čerpadlo: Iso Pump G1310A
- UV/VIS detektor: VWD G1414B s proměnnou vlnovou délkou
- Kolony: Zorbax Eclipse plus C18, oktadecylsilanový sorbent, průměr 4,6mm, délka 150mm, zrnitost 5mikrometrů
- Software: ChemStation

Luminiscenční spektrofluorometr, Aminco Bowman Series 2, Thermo Fisher, USA

- Křemenná kyveta 1 cm
- Software: AB2

4.3 Roztoky

4.3.1 Příprava donorového roztoku kofeinu pro permeaci

Ke standardizaci sublingválních membrán jsme použili 4 % roztok kofeinu.

Složení:

| | |
|--------------|--------|
| Kofein | 1,0 g |
| Čištěná voda | 24,0 g |

Postup: Na analytických vahách jsme navážili 1,0 g kofeinu, kvantitativně jsme navážku převedli do odměrné baňky a postupně rozpustili ve vodě.

4.3.2 Příprava roztoků kofeinu pro kalibraci

Pro HPLC stanovení kofeinu jsme připravili řadu kofeinových roztoků o známé koncentraci (**Tab. 4.1**), abychom mohli sestavit kalibrační křivku.

Jako mobilní fázi jsme použili směs methanolu a vody pro HPLC v poměru 25:75 s přídavkem kyseliny mravenčí (0,2%). Všechny vzorky jsme měřili při $\lambda = 282$ nm.

Kalibrační hodnoty byly odečítány pro každou koncentraci nejméně 6krát, v příslušných regresích bylo počítáno s aritmetickými průměry z opakovaných měření.

Tab. 4.1: Koncentrace kalibračních roztoků kofeinu

| Číslo | Koncentrace [mg/100ml] |
|-------|---------------------------|
| 1 | 0,1 |
| 2 | 1 |
| 3 | 10 |
| 4 | 25 |
| 5 | 50 |
| 6 | 100 |

4.3.3 Příprava fosforečnanového pufru

Fosforečnanový pufr o pH = 7,4 bez přídavku azidu sodného jsme použili jako akceptorovou fázi a v případě s přídavkem azidu sodného k vymytí a eluci očištěných sublingválních membrán.

Složení:

| | |
|--|----------|
| NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O | 2,1 g/l |
| Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O | 19,1 g/l |
| NaCl | 4,4 g/l |
| NaN ₃ | 0,02 g/l |

Postup: Rozpustili jsme dihydrogenfosforečnan sodný v 500,0ml vody a hydrogenfosforečnan sodný v 400,0 ml vody. V případě přípravy pufru pro vymytí membrán jsme ještě navíc rozpustili azid sodný v 500,0 ml dihydrogenfosforečnanového roztoku. K přibližně 200,0 ml roztoku hydrogenfosforečnanu jsme přidali 500,0 ml roztoku dihydrogenfosforečnanu a změřili jsme pH. Za stálého míchání na magnetické míchačce jsme doladili pH postupným přidáváním roztoku hydrogenfosforečnanu na požadovanou hodnotu.

Po dosažení požadovaného pH jsme zjistili přesný objem roztoku. Vzhledem k tomuto objemu jsme dopočítali a dovážili potřebné množství chloridu sodného určeného k izotonizaci.

4.3.4 Příprava 1% roztoků dextranů

Jako donorových vzorků pro permeační pokusy jsme použili 1% roztok některého z 3 fluorescenčně značených dextranů, konkrétně dextranu 4 000, dextranu 20 000 a dextranu o molekulové hmotnosti 40 000.

Složení:

| | |
|-----------------|---------|
| Dextran | 50,0 mg |
| Voda na injekci | 4,95 g |

Postup: Na analytických vahách jsme navážili 50,0 mg příslušného dextranu. Navážku jsme analyticky převedli do vialky a doplnili vodou do 5,0 g. Vialku jsme promíchali, zabalili do fólie z alobalu a uchovávali jsme ji v chladničce.

4.3.5 Kalibrace roztoků dextranu

K permeačnímu pokusu jsme použili dextrany o 3 různých molekulových hmotností značené fluorescein-isothiokyanátem. Měření jejich koncentrací ve vodných roztocích jsme provedli na luminiscenčním spektrometru uvedeném v části Přístroje. Analogicky jako v případě roztoků kofeinu jsme před vlastním měřením permeace dextranů proměřili kalibrační závislost (**Tab. 4.2**).

Tab. 4.2: Údaje pro kalibrace fluorescenčně značeného dextranu 4 000

| Koncentrace [mg/100ml] | Emitance E |
|---------------------------|------------|
| 2 | 0,323181 |
| 4 | 0,665588 |
| 6 | 0,957642 |
| 8 | 1,34766 |
| 10 | 1,60339 |

4.4 Permeační pokus

4.4.1 Příprava sublingvální membrány

Jazyky z prasete domácího jsme získali z místního masokombinátu. Předem bylo zajištěno kvalifikované zacházení s nimi tak, aby jazyky splňovaly parametry pro využití v permeačním experimentu. Opatrným způsobem jsme po malých částech odstranili

svalovinu, až jsme získali čistou sublingvální membránu. Membrány se uchovávaly v pufru o pH = 7,4 s přídavkem azidu sodného. Membrány jsme po separaci osušili, pečlivě zatačili do folie a přenesli do mrazničky, kde zůstaly při cca -18 °C pro pozdější využití.

4.4.2 Permeační komůrka

Pro hodnocení permeability sublingvální membrány jsme používali modifikaci Franzovy difúzní cely pro horizontálně umístěné membrány, rozdělující komůrku na donorovou část a akceptorovou část. Do akceptorové části jsme vložili míchadélko a naplnili ji fosforečnanovým pufrem.

Do donorové části jsme umístili testovací roztoky dextranů. Mezi dvě základní části se vkládají plexisklíčka s upevněnou sublingvální membránou. Každá permeační cela má poněkud jiný objem akceptorové části, což se musí zohlednit při dalších výpočtech, a proto byl pečlivě zaznamenán. Akceptorová část umožňuje průběžné odebírání vzorků a zpětné doplňování pufru. Každá permeační cela je umístěna do vodní lázně o teplotě 37 °C na desku s magnetickými míchadly, která zajišťuje neustálé promíchávání akceptorové fáze. Teplota ve vodní lázni byla udržována termostatem a sledována teploměrem.

4.4.3 Permeační standardizace sublingvální membrány kofeinem

K permeačním měřením jsme použili zmražené sublingvální membrány (datum zpracování 5/05/2010). Po rozmražení jsme membrány rozřezali na čtverce o velikosti cca 2x2 cm a vložili je do permeační cely. Plocha, která byla k dispozici pro průnik látek, činila 2 cm². Jako akceptorovou fázi jsme vždy aplikovali pufr o pH=7,4 bez přídavku azidu sodného. Jako donorovou fázi jsme použili připravený 4% roztok kofeinu. Do donorové části jsme pomocí pipety aplikovali 0,5 ml kofeinového roztoku. Tento čas byl považován za nulový. V pravidelných intervalech jsme odebírali vzorky, v našem případě to znamenalo po 1., 2., 3. a 4. hodině. Objem odebíraných vzorků činil většinou 0,6 ml. Po každém odběru se doplňovala akceptorová fáze o stejný objem, který byl předtím odebrán. Odebrané vzorky jsme ukládali do skleněných vialek, řádně označených a připravených pro HPLC analýzu.

4.4.4 Transmembránový in vitro sublingvální průnik dextranů

Po zadaném časovém úseku permeací potřebném pro posouzení standardnosti sublingválních membrán pomocí roztoku kofeinu jsme zcela vyměnili akceptorovou fázi a opět jsme použili fosfátový pufr o pH = 7,4 (bez přídavku azidu sodného) a zároveň jsme pečlivě vyčistili i donorovou část. Permeační cely jsme měli očíslované. Pomocí pipety jsme aplikovali 0,8 ml roztoku dextranů do donorové části. Přehled použití donorových vzorků s dextrany o různé molekulové hmotnosti do různých difúzních cel je uveden v **Tab. 4.3**.

Jak z **Tab. 4.3** vyplývá, pro každou molekulovou hmotnost jsme měli připraveno 6 permeačních buněk s membránou. Během pokusu ovšem byla poškozena sublingvální membrána č. 12 a proto byly další úkony s ní ukončeny a měření zrušeno. Dextrany o molekulové hmotnosti 20 000 jsme hodnotili jen na 5 vzorcích sublingválních membrán.

Tab. 4.3: Umístění dextranů v permeačních celách se sublingválními membránami

| Číslo Membrány | Molekulová hmotnost Dextranu |
|----------------|------------------------------|
| 1 – 6 | 4 000 |
| 7 – 11 | 20 000 |
| 13 - 18 | 40 000 |

Vzorky z akceptorové části permeačních buněk jsme odebírali po 4., 8., 18., 22., 26. a po 48. hodině do skleněných vialek. Objem odebraných vzorků činil 0,6ml.

4.4.5 Protokoly z permeačních měření

Výsledky z permeačních pokusů byly získány převedením dat vygenerovaných softwarem ChemStation chromatografu Agilent 1200 do programové aplikace v Excelu a jejich následným zpracováním pomocí speciální šablony pro hodnocení permeací, která je v laboratoři katedry farmaceutické technologie k dispozici.

Zpracování dat z ChemStation k převedení do permeační šablony prováděli Mgr. Pavel Berka a Mgr. Petr Vrbata.

V samostatné kapitole **5. Dokumenty** jsou v tabulkové podobě shrnuty informace z jednotlivých dílčích permeačních měření na 17 sublingválních membránách. Z každého protokolu je zřejmý objem akceptorové fáze, plocha membrány a časové intervaly odebrání vzorků. Pro hodnocení nás zajímaly hodnoty fluxů J [$\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$] kofeinu, které byly také porovnávány s fluxem dextranů.

4.4.6 Vysvětlení zkratk použitých v protokolech

c_{nk} = nekorigovaná koncentrace

c_k = korigovaná koncentrace; zohledňuje průběžný odběr a doplňování akceptorové fáze

$Q_t = Q_{t(\text{exp})}$ [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$] = množství látky, které se projde membránou o ploše 1 cm^2 do akceptorové fáze v příslušném čase (t)

Q_t [μg] = množství látky, které se projde membránou do akceptorové fáze

$Q_{t(\text{teor})}$ [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$] = množství látky, které se projde membránou o ploše 1 cm^2 do akceptorové fáze dle odečtu z regresní přímky

5 DOKUMENTACE

Protokol 1

| | |
|------------------|------------------------------------|
| V_o | [ml] |
| t | [h] |
| C_{nk} | [mg/100ml] |
| ΔV_{dop} | [ml] |
| C_k | [mg/100ml] |
| Q_t | [μ g] ve V_o |
| Q_t | [μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$ |

$V_o = 19,2$

Subling. membrána

Donor: 4 Kofein

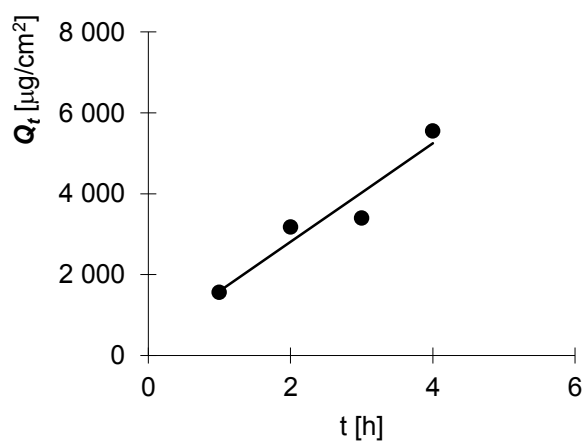
Měření: $\lambda = 282\text{nm}$

Plocha 2

| t | C_{nk} | ΔV_{dop} | C_k | Q_t | Q_t |
|---|----------|------------------|--------|----------|---------|
| 1 | 16,255 | 0,6 | 16,255 | 3 121,0 | 1 560,5 |
| 2 | 32,611 | 0,6 | 33,119 | 6 358,9 | 3 179,5 |
| 3 | 34,388 | 0,6 | 35,423 | 6 801,3 | 3 400,6 |
| 4 | 56,709 | 0,6 | 57,816 | 11 100,7 | 5 550,3 |

| t | $Q_t (exp)$ | $Q_t (teor)$ |
|---|-------------|--------------|
| 1 | 1560,5 | 1594,1 |
| 2 | 3179,5 | 2813,2 |
| 3 | 3400,6 | 4032,3 |
| 4 | 5550,3 | 5251,3 |

| Parametry regrese | |
|-------------------|------------|
| Počet bodů | n = 4 |
| Flux | J = 1219,1 |
| Abs. člen | q = 375,1 |
| Korelační koef. | r = 0,9605 |



Protokol

2

| | |
|------------------|------------------------------------|
| V_o | [ml] |
| t | [h] |
| C_{nk} | [mg/100ml] |
| ΔV_{dop} | [ml] |
| C_k | [mg/100ml] |
| Q_t | [μ g] ve V_o |
| Q_t | [μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$ |

$V_o = 17,6$

Subling. membrána

Donor: 4 Kofein

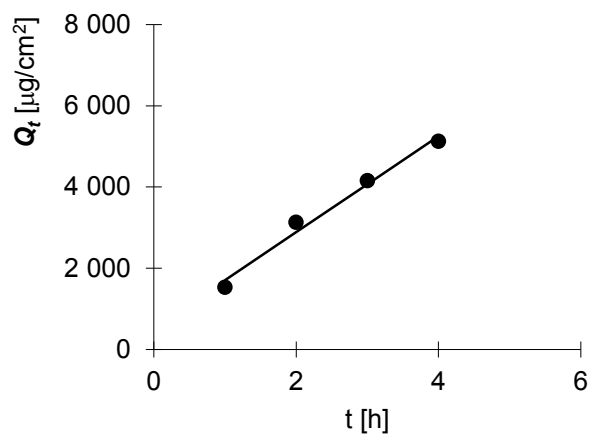
Měření: $\lambda = 282\text{nm}$

Plocha 2

| t | C_{nk} | ΔV_{dop} | C_k | Q_t | Q_t |
|---|----------|------------------|--------|----------|---------|
| 1 | 17,324 | 0,6 | 17,324 | 3 049,0 | 1 524,5 |
| 2 | 34,876 | 0,6 | 35,466 | 6 242,1 | 3 121,0 |
| 3 | 45,955 | 0,6 | 47,164 | 8 300,9 | 4 150,4 |
| 4 | 56,567 | 0,6 | 58,175 | 10 238,8 | 5 119,4 |

| t | $Q_t (exp)$ | $Q_t (teor)$ |
|---|-------------|--------------|
| 1 | 1524,5 | 1706,7 |
| 2 | 3121,0 | 2888,1 |
| 3 | 4150,4 | 4069,6 |
| 4 | 5119,4 | 5251,0 |

| Parametry regrese | |
|-------------------|--------------|
| Počet bodů | $n = 4$ |
| Flux | $J = 1181,4$ |
| Abs. člen | $q = 525,4$ |
| Korelační koef. | $r = 0,9921$ |



Protokol

3

| | |
|------------------|------------------------------------|
| V_o | [ml] |
| t | [h] |
| C_{nk} | [mg/100ml] |
| ΔV_{dop} | [ml] |
| C_k | [mg/100ml] |
| Q_t | [μ g] ve V_o |
| Q_f | [μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$ |

$V_o = 17,8$

Subling. membrána

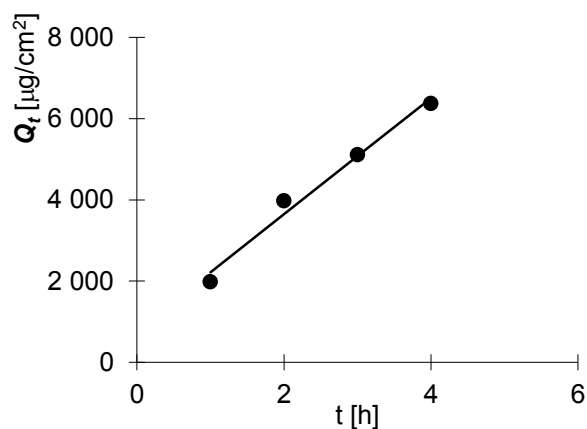
Donor: 4 Kofein

Měření: $\lambda = 282\text{nm}$
Plocha 2

| t | C_{nk} | ΔV_{dop} | C_k | Q_t | Q_f |
|-----|----------|------------------|--------|----------|---------|
| 1 | 22,290 | 0,6 | 22,290 | 3 967,6 | 1 983,8 |
| 2 | 43,922 | 0,6 | 44,673 | 7 951,8 | 3 975,9 |
| 3 | 55,925 | 0,6 | 57,431 | 10 222,8 | 5 111,4 |
| 4 | 69,628 | 0,6 | 71,563 | 12 738,3 | 6 369,1 |

| t | $Q_t (exp)$ | $Q_t (teor)$ |
|-----|-------------|--------------|
| 1 | 1983,8 | 2216,3 |
| 2 | 3975,9 | 3645,5 |
| 3 | 5111,4 | 5074,6 |
| 4 | 6369,1 | 6503,8 |

| Parametry regrese | |
|-------------------|--------------|
| Počet bodů | $n = 4$ |
| Flux | $J = 1429,1$ |
| Abs. člen | $q = 787,2$ |
| Korelační koef. | $r = 0,9912$ |



| | |
|------------------|------------------------------------|
| V_o | [ml] |
| t | [h] |
| C_{nk} | [mg/100ml] |
| ΔV_{dop} | [ml] |
| C_k | [mg/100ml] |
| Q_t | [μ g] ve V_o |
| Q_t | [μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$ |

$V_o = 17$

Subling. membrána

Donor: 4 Kofein

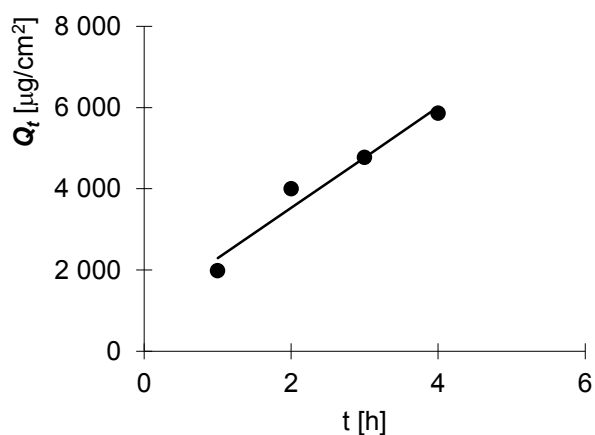
Měření: $\lambda = 282\text{nm}$

Plocha 2

| t | C_{nk} | ΔV_{dop} | C_k | Q_t | Q_t |
|---|----------|------------------|--------|----------|---------|
| 1 | 23,284 | 0,6 | 23,284 | 3 958,3 | 1 979,2 |
| 2 | 46,261 | 0,6 | 47,083 | 8 004,1 | 4 002,1 |
| 3 | 54,430 | 0,6 | 56,092 | 9 535,7 | 4 767,8 |
| 4 | 66,904 | 0,6 | 68,884 | 11 710,3 | 5 855,1 |

| t | $Q_t (exp)$ | $Q_t (teor)$ |
|---|-------------|--------------|
| 1 | 1979,2 | 2292,0 |
| 2 | 4002,1 | 3531,4 |
| 3 | 4767,8 | 4770,7 |
| 4 | 5855,1 | 6010,1 |

| Parametry regrese | |
|-------------------|--------------|
| Počet bodů | $n = 4$ |
| Flux | $J = 1239,4$ |
| Abs. člen | $q = 1052,6$ |
| Korelační koef. | $r = 0,9784$ |



| | |
|------------------|------------------------------------|
| V_o | [ml] |
| t | [h] |
| C_{nk} | [mg/100ml] |
| ΔV_{dop} | [ml] |
| C_k | [mg/100ml] |
| Q_t | [μ g] ve V_o |
| Q_f | [μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$ |

$V_o = 18,6$

Subling. membrána

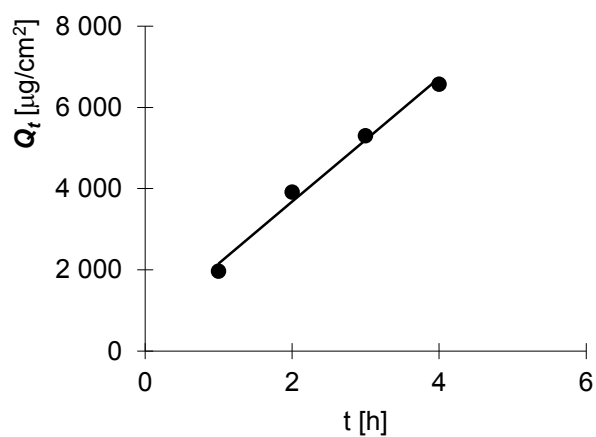
Donor: 4 Kofein

Měření: $\lambda = 282\text{nm}$
Plocha 2

| t | C_{nk} | ΔV_{dop} | C_k | Q_t | Q_f |
|---|----------|------------------|--------|----------|---------|
| 1 | 21,149 | 0,6 | 21,149 | 3 933,7 | 1 966,9 |
| 2 | 41,379 | 0,6 | 42,061 | 7 823,4 | 3 911,7 |
| 3 | 55,653 | 0,6 | 57,010 | 10 603,8 | 5 301,9 |
| 4 | 68,820 | 0,6 | 70,659 | 13 142,5 | 6 571,2 |

| t | $Q_t (exp)$ | $Q_t (teor)$ |
|---|-------------|--------------|
| 1 | 1966,9 | 2157,4 |
| 2 | 3911,7 | 3677,8 |
| 3 | 5301,9 | 5198,1 |
| 4 | 6571,2 | 6718,4 |

| Parametry regrese | |
|-------------------|------------|
| Počet bodů | n = 4 |
| Flux | J = 1520,3 |
| Abs. člen | q = 637,1 |
| Korelační koef. | r = 0,9947 |



| | |
|------------------|------------------------------------|
| V_o | [ml] |
| t | [h] |
| C_{nk} | [mg/100ml] |
| ΔV_{dop} | [ml] |
| C_k | [mg/100ml] |
| Q_t | [μ g] ve V_o |
| Q_f | [μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$ |

$V_o = 17,6$

Subling. membrána

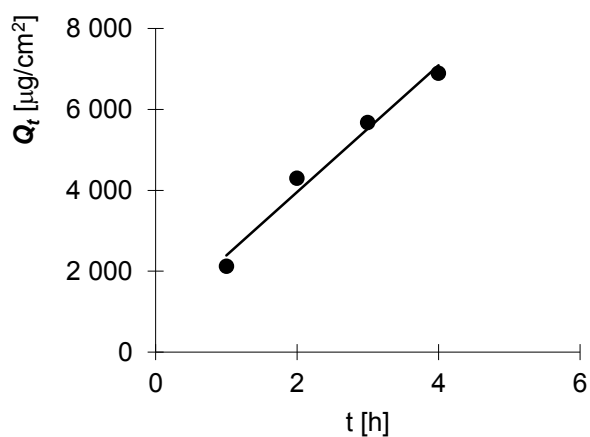
Donor: 4 Kofein

Měření: $\lambda = 282\text{nm}$
Plocha 2

| t | C_{nk} | ΔV_{dop} | C_k | Q_t | Q_f |
|---|----------|------------------|--------|----------|---------|
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1 | 24,054 | 0,6 | 24,054 | 4 233,5 | 2 116,7 |
| 2 | 47,968 | 0,6 | 48,788 | 8 586,7 | 4 293,3 |
| 3 | 62,779 | 0,6 | 64,443 | 11 341,9 | 5 671,0 |
| 4 | 76,090 | 0,6 | 78,287 | 13 778,6 | 6 889,3 |

| t | $Q_t (exp)$ | $Q_t (teor)$ |
|---|-------------|--------------|
| 1 | 2116,7 | 2388,3 |
| 2 | 4293,3 | 3957,8 |
| 3 | 5671,0 | 5527,3 |
| 4 | 6889,3 | 7096,9 |

| Parametry regrese | |
|-------------------|--------------|
| Počet bodů | $n = 4$ |
| Flux | $J = 1569,5$ |
| Abs. člen | $q = 818,8$ |
| Korelační koef. | $r = 0,9900$ |



| | |
|------------------|------------------------------------|
| V_o | [ml] |
| t | [h] |
| C_{nk} | [mg/100ml] |
| ΔV_{dop} | [ml] |
| C_k | [mg/100ml] |
| Q_t | [μ g] ve V_o |
| Q_f | [μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$ |

$V_o = 16,8$

Subling. membrána

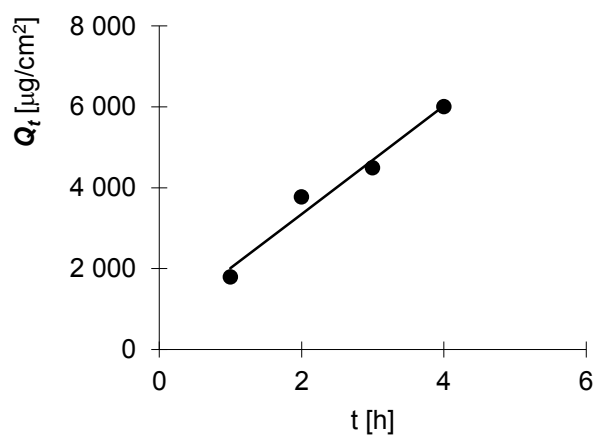
Donor: 4 Kofein

Měření: $\lambda = 282\text{nm}$
Plocha 2

| t | C_{nk} | ΔV_{dop} | C_k | Q_t | Q_f |
|---|----------|------------------|--------|----------|---------|
| 1 | 21,317 | 0,6 | 21,317 | 3 581,2 | 1 790,6 |
| 2 | 44,181 | 0,6 | 44,942 | 7 550,3 | 3 775,2 |
| 3 | 51,886 | 0,6 | 53,491 | 8 986,5 | 4 493,3 |
| 4 | 69,583 | 0,6 | 71,494 | 12 011,0 | 6 005,5 |

| t | $Q_t (exp)$ | $Q_t (teor)$ |
|---|-------------|--------------|
| 1 | 1790,6 | 2011,7 |
| 2 | 3775,2 | 3348,0 |
| 3 | 4493,3 | 4684,3 |
| 4 | 6005,5 | 6020,5 |

| Parametry regrese | |
|-------------------|--------------|
| Počet bodů | $n = 4$ |
| Flux | $J = 1336,3$ |
| Abs. člen | $q = 675,4$ |
| Korelační koef. | $r = 0,9853$ |



| | |
|------------------|------------------------------------|
| V_o | [ml] |
| t | [h] |
| C_{nk} | [mg/100ml] |
| ΔV_{dop} | [ml] |
| C_k | [mg/100ml] |
| Q_t | [μ g] ve V_o |
| Q_f | [μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$ |

$V_o = 17,6$

Subling. membrána

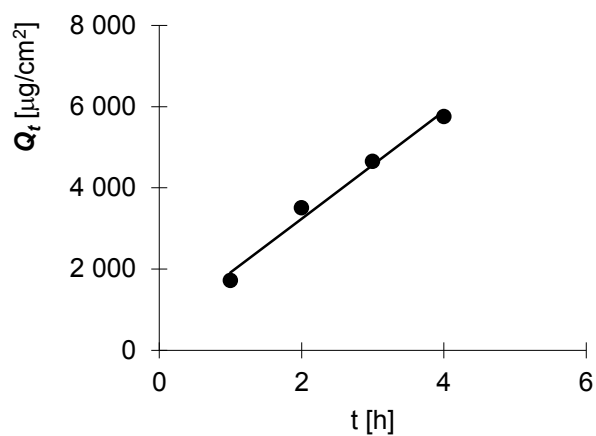
Donor: 4 Kofein

Měření: $\lambda = 282\text{nm}$
Plocha 2

| t | C_{nk} | ΔV_{dop} | C_k | Q_t | Q_f |
|---|----------|------------------|--------|----------|---------|
| 1 | 19,454 | 0,6 | 19,454 | 3 423,9 | 1 712,0 |
| 2 | 39,097 | 0,6 | 39,760 | 6 997,8 | 3 498,9 |
| 3 | 51,390 | 0,6 | 52,745 | 9 283,2 | 4 641,6 |
| 4 | 63,522 | 0,6 | 65,320 | 11 496,3 | 5 748,1 |

| t | $Q_t (exp)$ | $Q_t (teor)$ |
|---|-------------|--------------|
| 1 | 1712,0 | 1912,5 |
| 2 | 3498,9 | 3237,6 |
| 3 | 4641,6 | 4562,7 |
| 4 | 5748,1 | 5887,8 |

| Parametry regrese | |
|-------------------|--------------|
| Počet bodů | $n = 4$ |
| Flux | $J = 1325,2$ |
| Abs. člen | $q = 587,4$ |
| Korelační koef. | $r = 0,9924$ |



| | |
|------------------|------------------------------------|
| V_o | [ml] |
| t | [h] |
| C_{nk} | [mg/100ml] |
| ΔV_{dop} | [ml] |
| C_k | [mg/100ml] |
| Q_t | [μ g] ve V_o |
| Q_f | [μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$ |

$V_o = 17,6$

Subling. membrána

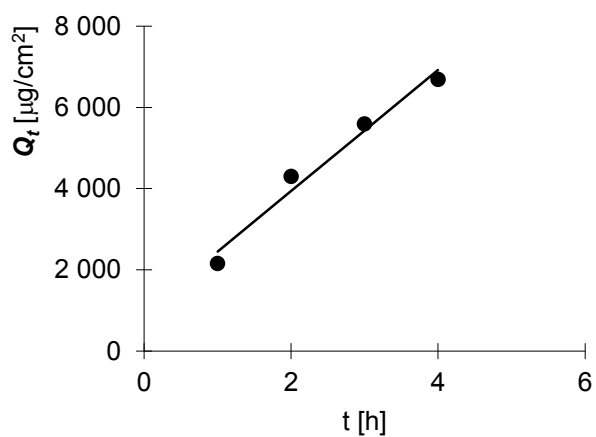
Donor: 4 Kofein

Měření: $\lambda = 282\text{nm}$
Plocha 2

| t | C_{nk} | ΔV_{dop} | C_k | Q_t | Q_f |
|---|----------|------------------|--------|----------|---------|
| 1 | 24,508 | 0,6 | 24,508 | 4 313,4 | 2 156,7 |
| 2 | 48,053 | 0,6 | 48,889 | 8 604,4 | 4 302,2 |
| 3 | 61,859 | 0,6 | 63,526 | 11 180,5 | 5 590,3 |
| 4 | 73,822 | 0,6 | 75,988 | 13 373,8 | 6 686,9 |

| t | $Q_t (exp)$ | $Q_t (teor)$ |
|---|-------------|--------------|
| 1 | 2156,7 | 2452,2 |
| 2 | 4302,2 | 3940,1 |
| 3 | 5590,3 | 5428,0 |
| 4 | 6686,9 | 6915,8 |

| Parametry regrese | |
|-------------------|--------------|
| Počet bodů | $n = 4$ |
| Flux | $J = 1487,9$ |
| Abs. člen | $q = 964,4$ |
| Korelační koef. | $r = 0,9868$ |



| | |
|------------------|------------------------------------|
| V_o | [ml] |
| t | [h] |
| C_{nk} | [mg/100ml] |
| ΔV_{dop} | [ml] |
| C_k | [mg/100ml] |
| Q_t | [μ g] ve V_o |
| Q_f | [μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$ |

$V_o = 18,8$

Subling. membrána

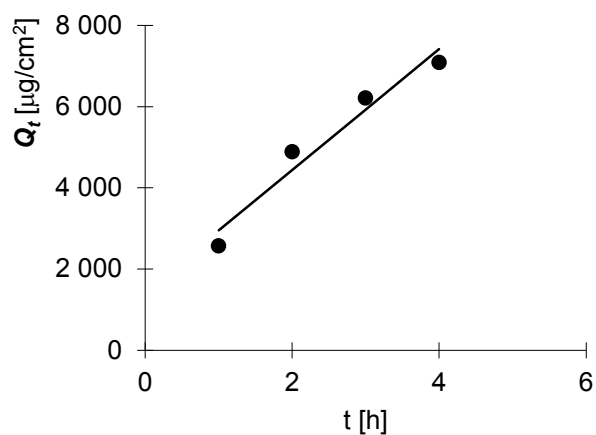
Donor: 4 Kofein

Měření: $\lambda = 282\text{nm}$
Plocha 2

| t | C_{nk} | ΔV_{dop} | C_k | Q_t | Q_f |
|---|----------|------------------|--------|----------|---------|
| 1 | 27,256 | 0,6 | 27,256 | 5 124,2 | 2 562,1 |
| 2 | 51,071 | 0,6 | 51,941 | 9 764,9 | 4 882,4 |
| 3 | 64,357 | 0,6 | 66,014 | 12 410,7 | 6 205,3 |
| 4 | 73,222 | 0,6 | 75,329 | 14 161,9 | 7 081,0 |

| t | $Q_t (exp)$ | $Q_t (teor)$ |
|---|-------------|--------------|
| 1 | 2562,1 | 2950,8 |
| 2 | 4882,4 | 4438,7 |
| 3 | 6205,3 | 5926,7 |
| 4 | 7081,0 | 7414,6 |

| Parametry regrese | |
|-------------------|--------------|
| Počet bodů | $n = 4$ |
| Flux | $J = 1487,9$ |
| Abs. člen | $q = 1462,8$ |
| Korelační koef. | $r = 0,9766$ |



| | |
|------------------|------------------------------------|
| V_o | [ml] |
| t | [h] |
| C_{nk} | [mg/100ml] |
| ΔV_{dop} | [ml] |
| C_k | [mg/100ml] |
| Q_t | [μ g] ve V_o |
| Q_f | [μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$ |

$V_o = 17,2$

Subling. membrána

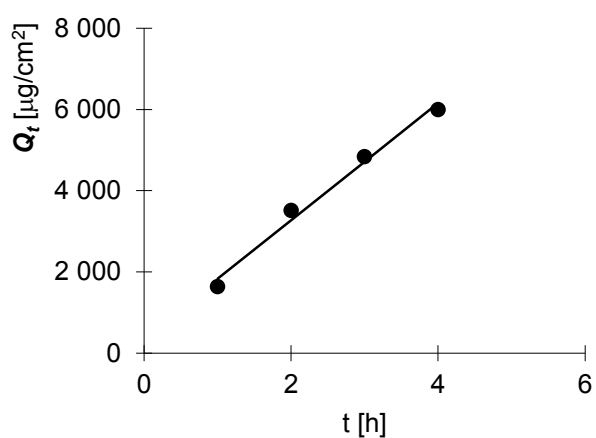
Donor: 4 Kofein

Měření: $\lambda = 282\text{nm}$
Plocha 2

| t | C_{nk} | ΔV_{dop} | C_k | Q_t | Q_f |
|---|----------|------------------|--------|----------|---------|
| 1 | 19,003 | 0,6 | 19,003 | 3 268,6 | 1 634,3 |
| 2 | 40,151 | 0,6 | 40,814 | 7 020,0 | 3 510,0 |
| 3 | 54,832 | 0,6 | 56,256 | 9 676,0 | 4 838,0 |
| 4 | 67,689 | 0,6 | 69,652 | 11 980,1 | 5 990,0 |

| t | $Q_t (exp)$ | $Q_t (teor)$ |
|---|-------------|--------------|
| 1 | 1634,3 | 1833,8 |
| 2 | 3510,0 | 3273,3 |
| 3 | 4838,0 | 4712,8 |
| 4 | 5990,0 | 6152,4 |

| Parametry regrese | |
|-------------------|--------------|
| Počet bodů | $n = 4$ |
| Flux | $J = 1439,5$ |
| Abs. člen | $q = 394,3$ |
| Korelační koef. | $r = 0,9934$ |



| | |
|------------------|------------------------------------|
| V_o | [ml] |
| t | [h] |
| C_{nk} | [mg/100ml] |
| ΔV_{dop} | [ml] |
| C_k | [mg/100ml] |
| Q_t | [μ g] ve V_o |
| Q_t | [μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$ |

$V_o = 16,2$

Subling. membrána

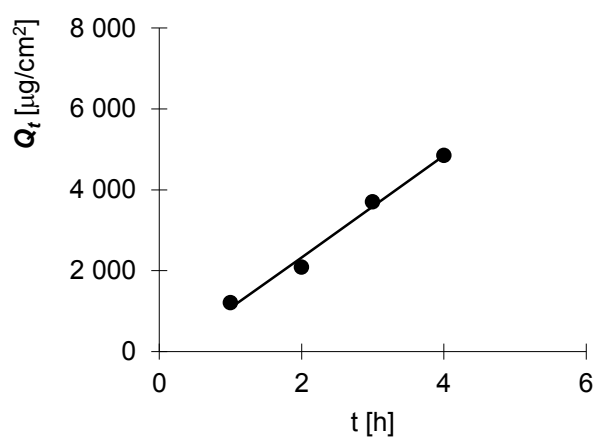
Donor: 4 Kofein

Měření: $\lambda = 282\text{nm}$
Plocha 2

| t | C_{nk} | ΔV_{dop} | C_k | Q_t | Q_t |
|---|----------|------------------|--------|---------|---------|
| 1 | 14,864 | 0,6 | 14,864 | 2 407,9 | 1 204,0 |
| 2 | 25,159 | 0,6 | 25,710 | 4 165,0 | 2 082,5 |
| 3 | 44,703 | 0,6 | 45,655 | 7 396,1 | 3 698,1 |
| 4 | 58,196 | 0,6 | 59,887 | 9 701,7 | 4 850,8 |

| t | $Q_t (exp)$ | $Q_t (teor)$ |
|---|-------------|--------------|
| 1 | 1204,0 | 1075,4 |
| 2 | 2082,5 | 2331,0 |
| 3 | 3698,1 | 3586,6 |
| 4 | 4850,8 | 4842,3 |

| Parametry regrese | |
|-------------------|--------------|
| Počet bodů | $n = 4$ |
| Flux | $J = 1255,6$ |
| Abs. člen | $q = -180,2$ |
| Korelační koef. | $r = 0,9943$ |



| | |
|------------------|------------------------------------|
| V_o | [ml] |
| t | [h] |
| C_{nk} | [mg/100ml] |
| ΔV_{dop} | [ml] |
| C_k | [mg/100ml] |
| Q_t | [μ g] ve V_o |
| Q_f | [μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$ |

$V_o = 17,6$

Subling. membrána

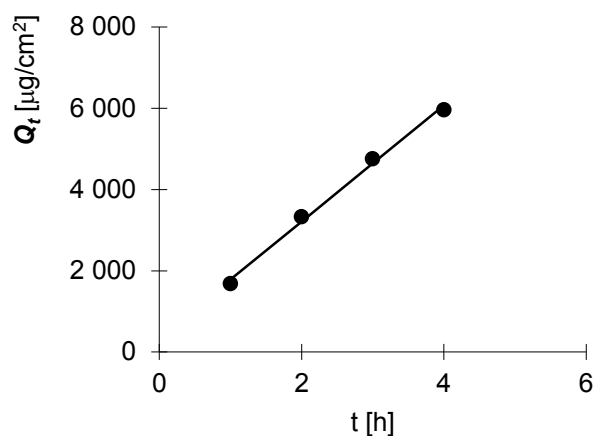
Donor: 4 Kofein

Měření: $\lambda = 282\text{nm}$
Plocha 2

| t | C_{nk} | ΔV_{dop} | C_k | Q_t | Q_f |
|---|----------|------------------|--------|----------|---------|
| 1 | 19,016 | 0,6 | 19,016 | 3 346,9 | 1 673,4 |
| 2 | 37,128 | 0,6 | 37,776 | 6 648,6 | 3 324,3 |
| 3 | 52,742 | 0,6 | 54,030 | 9 509,2 | 4 754,6 |
| 4 | 65,882 | 0,6 | 67,724 | 11 919,5 | 5 959,7 |

| t | $Q_t (exp)$ | $Q_t (teor)$ |
|---|-------------|--------------|
| 1 | 1673,4 | 1784,6 |
| 2 | 3324,3 | 3213,6 |
| 3 | 4754,6 | 4642,5 |
| 4 | 5959,7 | 6071,4 |

| Parametry regrese | |
|-------------------|--------------|
| Počet bodů | $n = 4$ |
| Flux | $J = 1428,9$ |
| Abs. člen | $q = 355,7$ |
| Korelační koef. | $r = 0,9976$ |



| | |
|------------------|------------------------------------|
| V_o | [ml] |
| t | [h] |
| C_{nk} | [mg/100ml] |
| ΔV_{dop} | [ml] |
| C_k | [mg/100ml] |
| Q_t | [μ g] ve V_o |
| Q_f | [μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$ |

$V_o = 16,8$

Subling. membrána

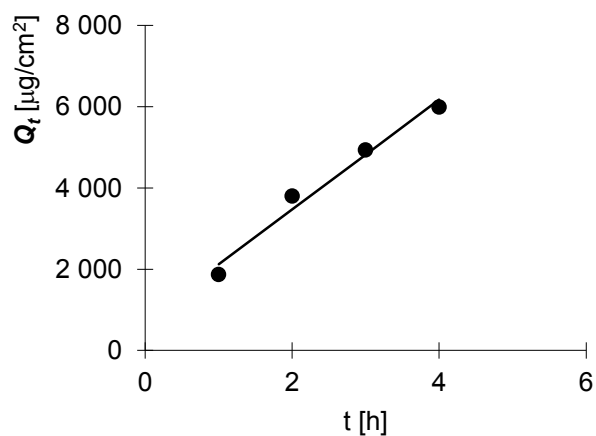
Donor: 4 Kofein

Měření: $\lambda = 282\text{nm}$
Plocha 2

| t | C_{nk} | ΔV_{dop} | C_k | Q_t | Q_f |
|---|----------|------------------|--------|----------|---------|
| 1 | 22,267 | 0,6 | 22,267 | 3 740,9 | 1 870,4 |
| 2 | 44,418 | 0,6 | 45,213 | 7 595,8 | 3 797,9 |
| 3 | 57,125 | 0,6 | 58,740 | 9 868,3 | 4 934,2 |
| 4 | 69,194 | 0,6 | 71,292 | 11 977,0 | 5 988,5 |

| t | $Q_t (exp)$ | $Q_t (teor)$ |
|---|-------------|--------------|
| 1 | 1870,4 | 2124,2 |
| 2 | 3797,9 | 3473,2 |
| 3 | 4934,2 | 4822,3 |
| 4 | 5988,5 | 6171,3 |

| Parametry regrese | |
|-------------------|--------------|
| Počet bodů | $n = 4$ |
| Flux | $J = 1349,0$ |
| Abs. člen | $q = 775,1$ |
| Korelační koef. | $r = 0,9884$ |



| | |
|------------------|------------------------------------|
| V_o | [ml] |
| t | [h] |
| C_{nk} | [mg/100ml] |
| ΔV_{dop} | [ml] |
| C_k | [mg/100ml] |
| Q_t | [μ g] ve V_o |
| Q_f | [μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$ |

$V_o = 17,8$

Subling. membrána

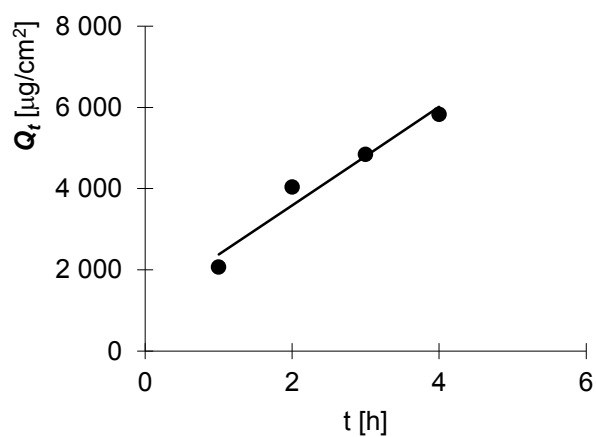
Donor: 4 Kofein

Měření: $\lambda = 282\text{nm}$
Plocha 2

| t | C_{nk} | ΔV_{dop} | C_k | Q_t | Q_f |
|---|----------|------------------|--------|----------|---------|
| 1 | 23,205 | 0,6 | 23,205 | 4 130,5 | 2 065,2 |
| 2 | 44,561 | 0,6 | 45,343 | 8 071,1 | 4 035,5 |
| 3 | 52,883 | 0,6 | 54,412 | 9 685,3 | 4 842,7 |
| 4 | 63,681 | 0,6 | 65,515 | 11 661,6 | 5 830,8 |

| t | $Q_t (exp)$ | $Q_t (teor)$ |
|---|-------------|--------------|
| 1 | 2065,2 | 2378,0 |
| 2 | 4035,5 | 3588,4 |
| 3 | 4842,7 | 4798,8 |
| 4 | 5830,8 | 6009,1 |

| Parametry regrese | |
|-------------------|--------------|
| Počet bodů | $n = 4$ |
| Flux | $J = 1210,4$ |
| Abs. člen | $q = 1167,6$ |
| Korelační koef. | $r = 0,9782$ |



| | |
|------------------|------------------------------------|
| V_o | [ml] |
| t | [h] |
| C_{nk} | [mg/100ml] |
| ΔV_{dop} | [ml] |
| C_k | [mg/100ml] |
| Q_t | [μ g] ve V_o |
| Q_f | [μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$ |

$V_o = 16,4$

Subling. membrána

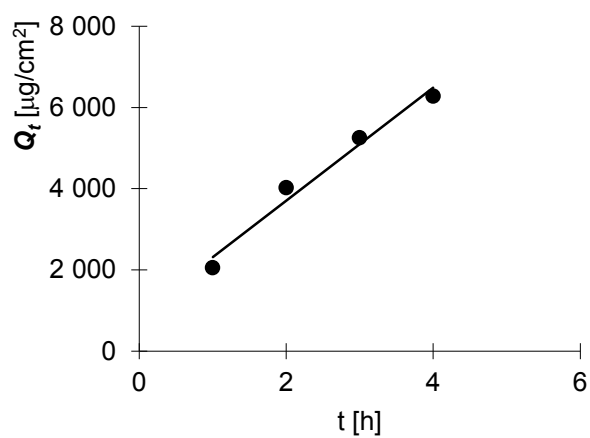
Donor: 4 Kofein

Měření: $\lambda = 282\text{nm}$
Plocha 2

| t | C_{nk} | ΔV_{dop} | C_k | Q_t | Q_f |
|---|----------|------------------|--------|----------|---------|
| 1 | 25,038 | 0,6 | 25,038 | 4 106,3 | 2 053,2 |
| 2 | 48,166 | 0,6 | 49,082 | 8 049,5 | 4 024,7 |
| 3 | 62,221 | 0,6 | 64,017 | 10 498,8 | 5 249,4 |
| 4 | 74,177 | 0,6 | 76,519 | 12 549,1 | 6 274,5 |

| t | $Q_t (exp)$ | $Q_t (teor)$ |
|---|-------------|--------------|
| 1 | 2053,2 | 2317,1 |
| 2 | 4024,7 | 3706,0 |
| 3 | 5249,4 | 5094,9 |
| 4 | 6274,5 | 6483,8 |

| Parametry regrese | |
|-------------------|--------------|
| Počet bodů | $n = 4$ |
| Flux | $J = 1388,9$ |
| Abs. člen | $q = 928,3$ |
| Korelační koef. | $r = 0,9879$ |



Protokol 18

| | |
|------------------|------------------------------------|
| V_o | [ml] |
| t | [h] |
| C_{nk} | [mg/100ml] |
| ΔV_{dop} | [ml] |
| C_k | [mg/100ml] |
| Q_t | [μ g] ve V_o |
| Q_f | [μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$ |

$V_o = 17,6$

Subling. membrána

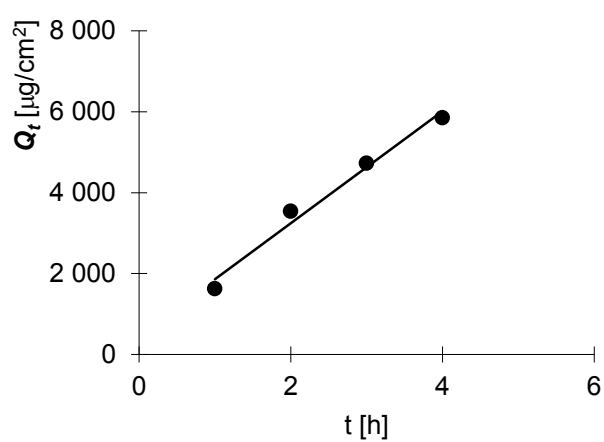
Donor: 4 Kofein

Měření: $\lambda = 282\text{nm}$
Plocha 2

| t | C_{nk} | ΔV_{dop} | C_k | Q_t | Q_f |
|---|----------|------------------|--------|----------|---------|
| 1 | 18,457 | 0,6 | 18,457 | 3 248,4 | 1 624,2 |
| 2 | 39,659 | 0,6 | 40,288 | 7 090,7 | 3 545,3 |
| 3 | 52,369 | 0,6 | 53,743 | 9 458,7 | 4 729,4 |
| 4 | 64,650 | 0,6 | 66,482 | 11 700,8 | 5 850,4 |

| t | $Q_t (exp)$ | $Q_t (teor)$ |
|---|-------------|--------------|
| 1 | 1624,2 | 1857,9 |
| 2 | 3545,3 | 3244,2 |
| 3 | 4729,4 | 4630,5 |
| 4 | 5850,4 | 6016,7 |

| Parametry regrese | |
|-------------------|--------------|
| Počet bodů | $n = 4$ |
| Flux | $J = 1386,3$ |
| Abs. člen | $q = 471,6$ |
| Korelační koef. | $r = 0,9906$ |



| | |
|------------------|------------------------------------|
| V_o | [ml] |
| t | [h] |
| C_{nk} | [mg/100ml] |
| ΔV_{dop} | [ml] |
| C_k | [mg/100ml] |
| Q_t | [μ g] ve V_o |
| Q_t | [μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$ |

$V_o = 17,2$

Subling. membrána

Donor: 1Dex4

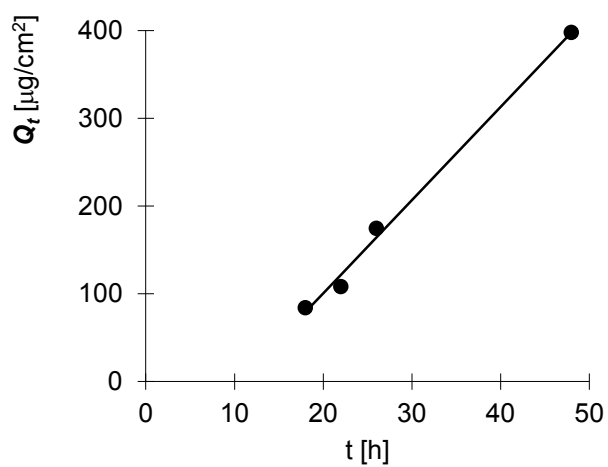
Měření: ExEm: 419/529

Plocha 2

| t | C_{nk} | ΔV_{dop} | C_k | Q_t | Q_t |
|----|----------|------------------|--------|-------|-------|
| 0 | 0,000 | 0,6 | 0,000 | 0,0 | 0,0 |
| 4 | -0,001 | 0,6 | -0,001 | -0,2 | -0,1 |
| 8 | 0,089 | 0,6 | 0,089 | 15,3 | 7,7 |
| 18 | 0,973 | 0,6 | 0,976 | 167,9 | 83,9 |
| 22 | 1,219 | 0,6 | 1,254 | 215,6 | 107,8 |
| 26 | 1,986 | 0,6 | 2,030 | 349,1 | 174,6 |
| 48 | 4,552 | 0 | 4,622 | 795,0 | 397,5 |

| t | $Q_t (exp)$ | $Q_t (teor)$ |
|----|-------------|--------------|
| 18 | 83,9 | 79,3 |
| 22 | 107,8 | 121,8 |
| 26 | 174,6 | 164,4 |
| 48 | 397,5 | 398,4 |

| Parametry regrese | |
|-------------------|--------------|
| Počet bodů | $n = 4$ |
| Flux | $J = 10,637$ |
| Abs. člen | $q = -112,2$ |
| Korelační koef. | $r = 0,9974$ |



Protokol 20

| | |
|------------------|------------------------------------|
| V_o | [ml] |
| t | [h] |
| C_{nk} | [mg/100ml] |
| ΔV_{dop} | [ml] |
| C_k | [mg/100ml] |
| Q_t | [μ g] ve V_o |
| Q_t | [μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$ |

$V_o = 16,6$

Subling. membrána

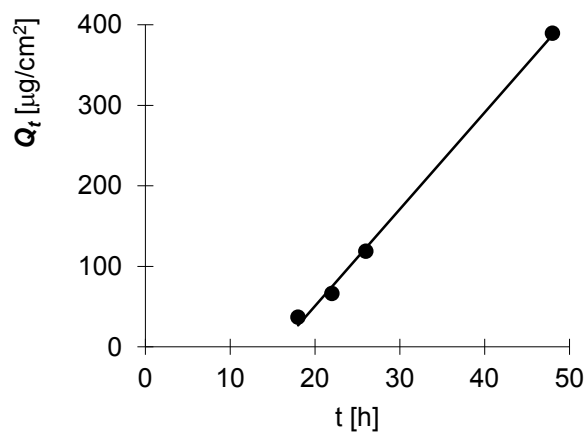
Donor: 1Dex4

Měření: ExEm: 419/529
Plocha 2

| t | C_{nk} | ΔV_{dop} | C_k | Q_t | Q_t |
|----|----------|------------------|--------|-------|-------|
| 0 | 0,000 | 0,6 | 0,000 | 0,0 | 0,0 |
| 4 | -0,007 | 0,6 | -0,007 | -1,1 | -0,6 |
| 8 | 0,036 | 0,6 | 0,036 | 6,0 | 3,0 |
| 18 | 0,444 | 0,6 | 0,446 | 74,0 | 37,0 |
| 22 | 0,782 | 0,6 | 0,798 | 132,5 | 66,2 |
| 26 | 1,402 | 0,6 | 1,431 | 237,5 | 118,7 |
| 48 | 4,640 | 0 | 4,691 | 778,8 | 389,4 |

| t | $Q_t (exp)$ | $Q_t (teor)$ |
|----|-------------|--------------|
| 18 | 37,0 | 26,7 |
| 22 | 66,2 | 74,7 |
| 26 | 118,7 | 122,8 |
| 48 | 389,4 | 387,2 |

| Parametry regrese | |
|-------------------|--------------|
| Počet bodů | $n = 4$ |
| Flux | $J = 12,0$ |
| Abs. člen | $q = -189,6$ |
| Korelační koef. | $r = 0,9987$ |



Protokol 21

| | |
|------------------|------------------------------------|
| V_o | [ml] |
| t | [h] |
| C_{nk} | [mg/100ml] |
| ΔV_{dop} | [ml] |
| C_k | [mg/100ml] |
| Q_t | [μ g] ve V_o |
| Q_f | [μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$ |

$V_o = 17,4$

Subling. membrána

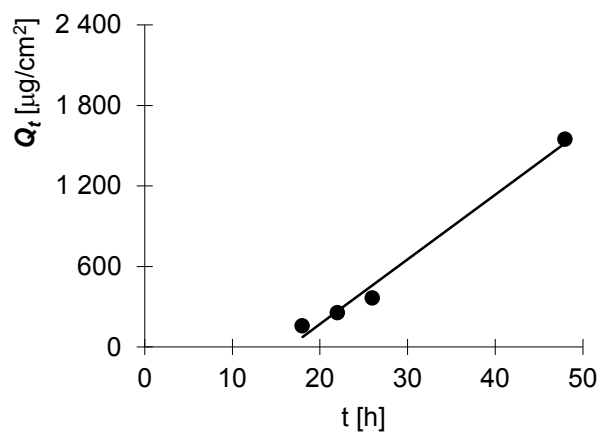
Donor: 1Dex4

Měření: ExEm: 419/529
Plocha 2

| t | C_{nk} | ΔV_{dop} | C_k | Q_t | Q_f |
|----|----------|------------------|--------|---------|---------|
| 0 | 0,000 | 0,6 | 0,000 | 0,0 | 0,0 |
| 4 | 0,021 | 0,6 | 0,021 | 3,7 | 1,8 |
| 8 | 0,216 | 0,6 | 0,217 | 37,7 | 18,9 |
| 18 | 1,800 | 0,6 | 1,808 | 314,5 | 157,3 |
| 22 | 2,871 | 0,6 | 2,933 | 510,4 | 255,2 |
| 26 | 4,084 | 0,6 | 4,185 | 728,1 | 364,1 |
| 48 | 17,631 | 0 | 17,775 | 3 092,9 | 1 546,4 |

| t | $Q_t (exp)$ | $Q_t (teor)$ |
|----|-------------|--------------|
| 18 | 157,3 | 75,5 |
| 22 | 255,2 | 268,0 |
| 26 | 364,1 | 460,4 |
| 48 | 1546,4 | 1519,0 |

| Parametry regrese | |
|-------------------|--------------|
| Počet bodů | $n = 4$ |
| Flux | $J = 48,1$ |
| Abs. člen | $q = -790,6$ |
| Korelační koef. | $r = 0,9933$ |



| | |
|------------------|------------------------------------|
| V_o | [ml] |
| t | [h] |
| C_{nk} | [mg/100ml] |
| ΔV_{dop} | [ml] |
| C_k | [mg/100ml] |
| Q_t | [μ g] ve V_o |
| Q_t | [μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$ |

$V_o = 17,4$

Subling. membrána

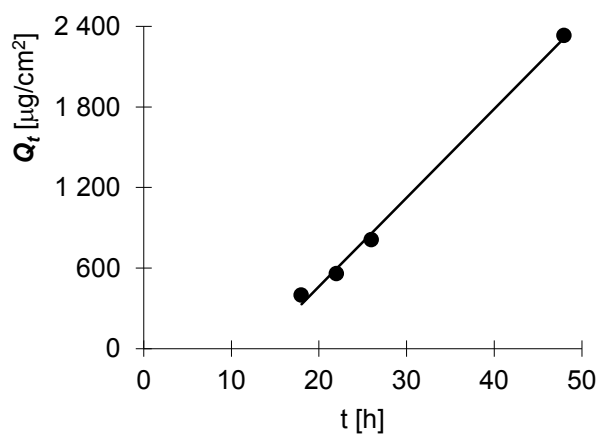
Donor: 1Dex4

Měření: ExEm: 419/529
Plocha 2

| t | C_{nk} | ΔV_{dop} | C_k | Q_t | Q_t |
|----|----------|------------------|--------|---------|---------|
| 0 | 0,000 | 0,6 | 0,000 | 0,0 | 0,0 |
| 4 | 0,107 | 0,6 | 0,107 | 18,6 | 9,3 |
| 8 | 0,665 | 0,6 | 0,669 | 116,4 | 58,2 |
| 18 | 4,552 | 0,6 | 4,575 | 796,1 | 398,0 |
| 22 | 6,268 | 0,6 | 6,426 | 1 118,1 | 559,1 |
| 26 | 9,105 | 0,6 | 9,326 | 1 622,8 | 811,4 |
| 48 | 26,505 | 0 | 26,826 | 4 667,7 | 2 333,9 |

| t | $Q_t (exp)$ | $Q_t (teor)$ |
|----|-------------|--------------|
| 18 | 398,0 | 330,7 |
| 22 | 559,1 | 595,4 |
| 26 | 811,4 | 860,2 |
| 48 | 2333,9 | 2316,0 |

| Parametry regrese | |
|-------------------|--------------|
| Počet bodů | $n = 4$ |
| Flux | $J = 66,2$ |
| Abs. člen | $q = -860,4$ |
| Korelační koef. | $r = 0,9982$ |



| | |
|------------------|------------------------------------|
| V_o | [ml] |
| t | [h] |
| C_{nk} | [mg/100ml] |
| ΔV_{dop} | [ml] |
| C_k | [mg/100ml] |
| Q_t | [μ g] ve V_o |
| Q_t | [μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$ |

$V_o = 18,4$

Subling. membrána

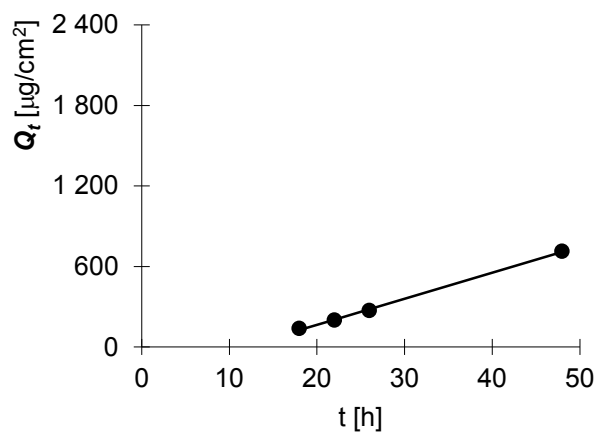
Donor: 1Dex4

Měření: ExEm: 419/529
Plocha 2

| t | C_{nk} | ΔV_{dop} | C_k | Q_t | Q_t |
|----|----------|------------------|--------|---------|-------|
| 0 | 0,000 | 0,6 | 0,000 | 0,0 | 0,0 |
| 4 | -0,008 | 0,6 | -0,008 | -1,5 | -0,7 |
| 8 | 0,144 | 0,6 | 0,143 | 26,4 | 13,2 |
| 18 | 1,496 | 0,6 | 1,501 | 276,1 | 138,0 |
| 22 | 2,115 | 0,6 | 2,164 | 398,1 | 199,1 |
| 26 | 2,884 | 0,6 | 2,955 | 543,7 | 271,9 |
| 48 | 7,642 | 0 | 7,739 | 1 423,9 | 712,0 |

| t | $Q_t (exp)$ | $Q_t (teor)$ |
|----|-------------|--------------|
| 18 | 138,0 | 126,5 |
| 22 | 199,1 | 204,1 |
| 26 | 271,9 | 281,7 |
| 48 | 712,0 | 708,7 |

| Parametry regrese | |
|-------------------|--------------|
| Počet bodů | $n = 4$ |
| Flux | $J = 19,4$ |
| Abs. člen | $q = -222,9$ |
| Korelační koef. | $r = 0,9993$ |



Protokol 24

| | |
|------------------|-----------------------------|
| V_o | [ml] |
| t | [h] |
| C_{nk} | [mg/100ml] |
| ΔV_{dop} | [ml] |
| C_k | [mg/100ml] |
| Q_t | [μ g] ve V_o |
| Q_t | [μ g] ve $V_o / 1cm^2$ |

$V_o = 17,8$

Subling. membrána

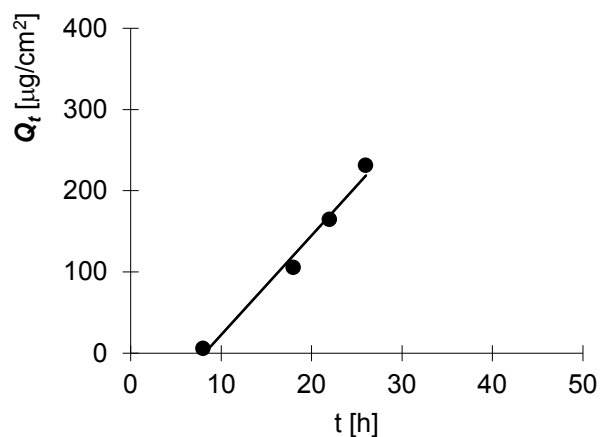
Donor: 1Dex4

Měření: ExEm: 419/529
Plocha 2

| t | C_{nk} | ΔV_{dop} | C_k | Q_t | Q_t |
|----|----------|------------------|--------|-------|-------|
| 0 | 0,000 | 0,6 | 0,000 | 0,0 | 0,0 |
| 4 | -0,012 | 0,6 | -0,012 | -2,2 | -1,1 |
| 8 | 0,064 | 0,6 | 0,064 | 11,4 | 5,7 |
| 18 | 1,181 | 0,6 | 1,183 | 210,7 | 105,3 |
| 22 | 1,807 | 0,6 | 1,847 | 328,7 | 164,4 |
| 26 | 2,533 | 0,6 | 2,595 | 461,9 | 230,9 |
| 48 | 4,171 | 0 | 4,258 | 758,0 | 379,0 |

| t | $Q_t (exp)$ | $Q_t (teor)$ |
|----|-------------|--------------|
| 8 | 5,7 | -2,2 |
| 18 | 105,3 | 120,5 |
| 22 | 164,4 | 169,5 |
| 26 | 230,9 | 218,5 |

| Parametry regrese | |
|-------------------|------------|
| Počet bodů | n = 4 |
| Flux | J = 12,3 |
| Abs. člen | q = -100,3 |
| Korelační koef. | r = 0,9914 |



| | |
|------------------|----------------------------|
| V_o | [ml] |
| t | [h] |
| C_{nk} | [mg/100ml] |
| ΔV_{dop} | [ml] |
| C_k | [mg/100ml] |
| Q_t | $\frac{[\mu g]}{V_o}$ ve |
| Q_t | $[\mu g]$ ve $V_o / 1cm^2$ |

$V_o = 17,2$

Subling. membrána

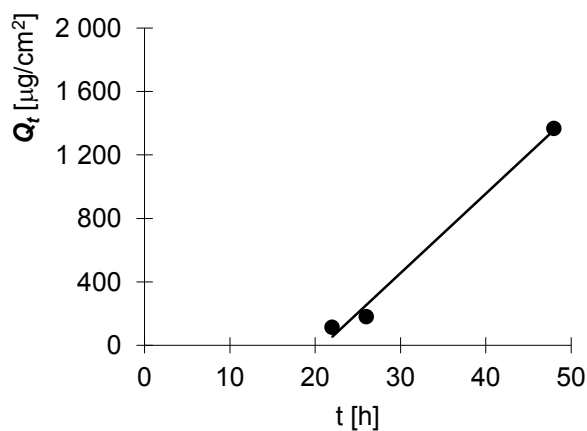
Donor: 1Dex20

Měření: ExEm: 419/529
Plocha 2

| t | C_{nk} | ΔV_{dop} | C_k | Q_t | Q_t |
|----|----------|------------------|--------|---------|---------|
| 0 | 0,000 | 0,6 | 0,000 | 0,0 | 0,0 |
| 4 | -0,016 | 0,6 | -0,016 | -2,7 | -1,4 |
| 8 | 0,102 | 0,6 | 0,102 | 17,5 | 8,8 |
| 18 | 0,944 | 0,6 | 0,947 | 163,0 | 81,5 |
| 22 | 1,249 | 0,6 | 1,282 | 220,6 | 110,3 |
| 26 | 1,976 | 0,6 | 2,021 | 347,6 | 173,8 |
| 48 | 15,134 | 0 | 15,205 | 2 615,2 | 1 307,6 |

| t | $Q_t (exp)$ | $Q_t (teor)$ |
|----|-------------|--------------|
| 18 | 81,5 | -39,3 |
| 22 | 110,3 | 135,0 |
| 26 | 173,8 | 309,3 |
| 48 | 1307,6 | 1268,2 |

| Parametry regrese | |
|-------------------|--------------|
| Počet bodů | $n = 4$ |
| Flux | $J = 43,6$ |
| Abs. člen | $q = -823,8$ |
| Korelační koef. | $r = 0,9833$ |



| | |
|------------------|----------------------------|
| V_o | [ml] |
| t | [h] |
| C_{nk} | [mg/100ml] |
| ΔV_{dop} | [ml] |
| C_k | [mg/100ml] |
| Q_t | $[\mu g]$ ve V_o |
| Q_t | $[\mu g]$ ve $V_o / 1cm^2$ |

$V_o = 17,8$

Subling. membrána

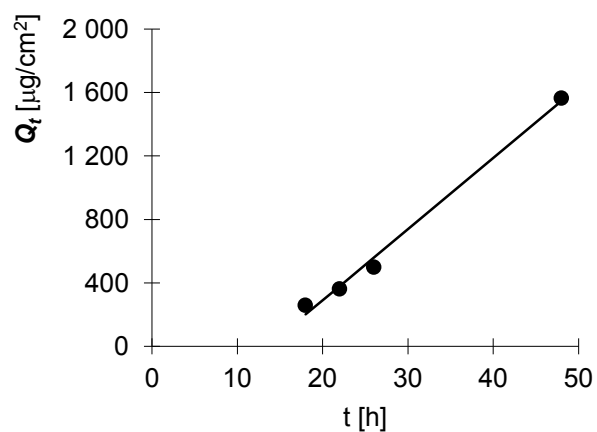
Donor: 1Dex20

Měření: ExEm: 419/529
Plocha 2

| t | C_{nk} | ΔV_{dop} | C_k | Q_t | Q_t |
|----|----------|------------------|--------|---------|---------|
| 0 | 0,000 | 0,6 | 0,000 | 0,0 | 0,0 |
| 4 | 0,050 | 0,6 | 0,050 | 8,8 | 4,4 |
| 8 | 0,432 | 0,6 | 0,434 | 77,2 | 38,6 |
| 18 | 2,778 | 0,6 | 2,792 | 497,0 | 248,5 |
| 22 | 3,812 | 0,6 | 3,906 | 695,2 | 347,6 |
| 26 | 5,246 | 0,6 | 5,378 | 957,2 | 478,6 |
| 48 | 16,628 | 0 | 16,809 | 2 992,0 | 1 496,0 |

| t | $Q_t (exp)$ | $Q_t (teor)$ |
|----|-------------|--------------|
| 18 | 248,5 | 192,6 |
| 22 | 347,6 | 364,0 |
| 26 | 478,6 | 535,5 |
| 48 | 1496,0 | 1478,6 |

| Parametry regrese | |
|-------------------|--------------|
| Počet bodů | $n = 4$ |
| Flux | $J = 42,9$ |
| Abs. člen | $q = -579,1$ |
| Korelační koef. | $r = 0,9965$ |



Protokol 27

| | |
|------------------|----------------------------|
| V_o | [ml] |
| t | [h] |
| C_{nk} | [mg/100ml] |
| ΔV_{dop} | [ml] |
| C_k | [mg/100ml] |
| Q_t | $[\mu g]$ ve V_o |
| Q_t | $[\mu g]$ ve $V_o / 1cm^2$ |

$V_o = 17$

Subling. membrána

Donor: 1Dex20

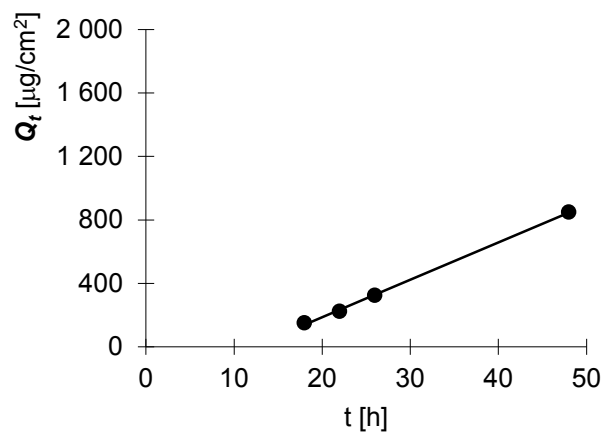
Měření: ExEm: 419/529

Plocha 2

| t | C_{nk} | ΔV_{dop} | C_k | Q_t | Q_t |
|-----|----------|------------------|-------|---------|-------|
| 0 | 0,000 | 0,6 | 0,000 | 0,0 | 0,0 |
| 4 | 0,016 | 0,6 | 0,016 | 2,7 | 1,3 |
| 8 | 0,214 | 0,6 | 0,215 | 36,5 | 18,3 |
| 18 | 1,696 | 0,6 | 1,703 | 289,6 | 144,8 |
| 22 | 2,464 | 0,6 | 2,524 | 429,0 | 214,5 |
| 26 | 3,566 | 0,6 | 3,655 | 621,4 | 310,7 |
| 48 | 9,417 | 0 | 9,546 | 1 622,8 | 811,4 |

| t | $Q_t (exp)$ | $Q_t (teor)$ |
|-----|-------------|--------------|
| 18 | 144,8 | 134,0 |
| 22 | 214,5 | 224,1 |
| 26 | 310,7 | 314,1 |
| 48 | 811,4 | 809,2 |

| Parametry regrese | |
|-------------------|--------------|
| Počet bodů | $n = 4$ |
| Flux | $J = 22,5$ |
| Abs. člen | $q = -271,1$ |
| Korelační koef. | $r = 0,9996$ |



Protokol 28

| | |
|------------------|--|
| V_o | [ml] |
| t | [h] |
| C_{nk} | [mg/100ml] |
| ΔV_{dop} | [ml] |
| C_k | [mg/100ml] |
| Q_t | $\frac{[\mu g]}{V_o}$ ve |
| Q_f | $\frac{[\mu g]}{V_o}$ ve $V_o / 1cm^2$ |

$V_o = 18,4$

Subling. membrána

Donor: 1Dex20

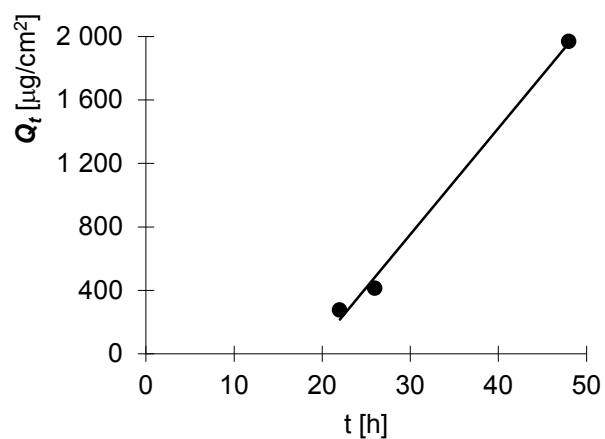
Měření: ExEm: 419/529

Plocha 2

| t | C_{nk} | ΔV_{dop} | C_k | Q_t | Q_f |
|----|----------|------------------|--------|---------|---------|
| 0 | 0,000 | 0,6 | 0,000 | 0,0 | 0,0 |
| 4 | -0,010 | 0,6 | -0,010 | -1,9 | -1,0 |
| 8 | 0,209 | 0,6 | 0,209 | 38,4 | 19,2 |
| 18 | 1,806 | 0,6 | 1,813 | 333,6 | 166,8 |
| 22 | 2,806 | 0,6 | 2,865 | 527,2 | 263,6 |
| 26 | 4,210 | 0,6 | 4,304 | 791,9 | 395,9 |
| 48 | 20,320 | 0 | 20,460 | 3 764,7 | 1 882,3 |

| t | $Q_t (exp)$ | $Q_t (teor)$ |
|----|-------------|--------------|
| 18 | 166,8 | 48,9 |
| 22 | 263,6 | 288,2 |
| 26 | 395,9 | 527,6 |
| 48 | 1882,3 | 1844,0 |

| Parametry regrese | |
|-------------------|---------------|
| Počet bodů | $n = 4$ |
| Flux | $J = 59,8$ |
| Abs. člen | $q = -1028,1$ |
| Korelační koef. | $r = 0,9914$ |



Protokol 29

| | |
|------------------|----------------------------|
| V_o | [ml] |
| t | [h] |
| C_{nk} | [mg/100ml] |
| ΔV_{dop} | [ml] |
| C_k | [mg/100ml] |
| Q_t | $\frac{[\mu g]}{V_o}$ ve |
| Q_t | $[\mu g]$ ve $V_o / 1cm^2$ |

$V_o = 17$

Subling. membrána

Donor: 1Dex20

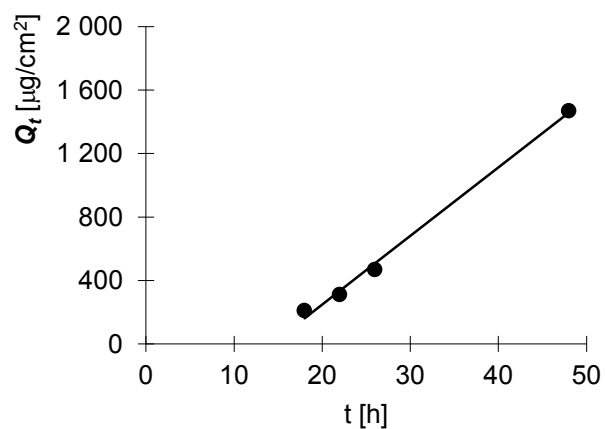
Měření: ExEm: 419/529

Plocha 2

| t | C_{nk} | ΔV_{dop} | C_k | Q_t | Q_t |
|----|----------|------------------|--------|---------|---------|
| 0 | 0,000 | 0,6 | 0,000 | 0,0 | 0,0 |
| 4 | 0,027 | 0,6 | 0,027 | 4,6 | 2,3 |
| 8 | 0,321 | 0,6 | 0,322 | 54,7 | 27,4 |
| 18 | 2,361 | 0,6 | 2,373 | 403,4 | 201,7 |
| 22 | 3,439 | 0,6 | 3,523 | 598,8 | 299,4 |
| 26 | 5,148 | 0,6 | 5,272 | 896,2 | 448,1 |
| 48 | 16,367 | 0 | 16,553 | 2 814,0 | 1 407,0 |

| t | $Q_t (exp)$ | $Q_t (teor)$ |
|----|-------------|--------------|
| 18 | 201,7 | 155,6 |
| 22 | 299,4 | 320,7 |
| 26 | 448,1 | 485,8 |
| 48 | 1407,0 | 1394,1 |

| Parametry regrese | |
|-------------------|--------------|
| Počet bodů | $n = 4$ |
| Flux | $J = 41,3$ |
| Abs. člen | $q = -587,5$ |
| Korelační koef. | $r = 0,9977$ |



Protokol 30

| | |
|------------------|------------------------------------|
| V_o | [ml] |
| t | [h] |
| C_{nk} | [mg/100ml] |
| ΔV_{dop} | [ml] |
| C_k | [mg/100ml] |
| Q_t | [μ g] ve V_o |
| Q_t | [μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$ |

$V_o = 16,2$

Subling. membrána

Donor: 1DEX40

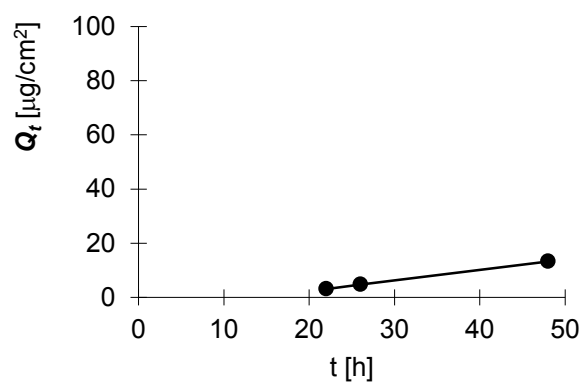
Měření: ExEm: 419/529

Plocha 2

| t | C_{nk} | ΔV_{dop} | C_k | Q_t | Q_t |
|----|----------|------------------|--------|-------|-------|
| 0 | 0,000 | 0,6 | 0,000 | 0,0 | 0,0 |
| 4 | -0,022 | 0,6 | -0,022 | -3,5 | -1,8 |
| 8 | -0,005 | 0,6 | -0,006 | -0,9 | -0,5 |
| 18 | 0,108 | 0,6 | 0,108 | 17,5 | 8,8 |
| 22 | 0,091 | 0,6 | 0,095 | 15,4 | 7,7 |
| 26 | 0,143 | 0,6 | 0,147 | 23,8 | 11,9 |
| 48 | 0,407 | 0 | 0,413 | 66,9 | 33,4 |

| t | Q_t (exp) | Q_t (teor) |
|----|-------------|--------------|
| 22 | 7,7 | 7,8 |
| 26 | 11,9 | 11,8 |
| 48 | 33,4 | 33,5 |

| Parametry regrese | |
|-------------------|--------------|
| Počet bodů | $n = 3$ |
| Flux | $J = 0,98$ |
| Abs. člen | $q = -13,9$ |
| Korelační koef. | $r = 0,9999$ |



| | |
|------------------|----------------------------|
| V_o | [ml] |
| t | [h] |
| C_{nk} | [mg/100ml] |
| ΔV_{dop} | [ml] |
| C_k | [mg/100ml] |
| Q_t | $\frac{[\mu g]}{V_o}$ ve |
| Q_t | $[\mu g]$ ve $V_o / 1cm^2$ |

$V_o = 17,2$

Subling. membrána

Donor: 1DEX40

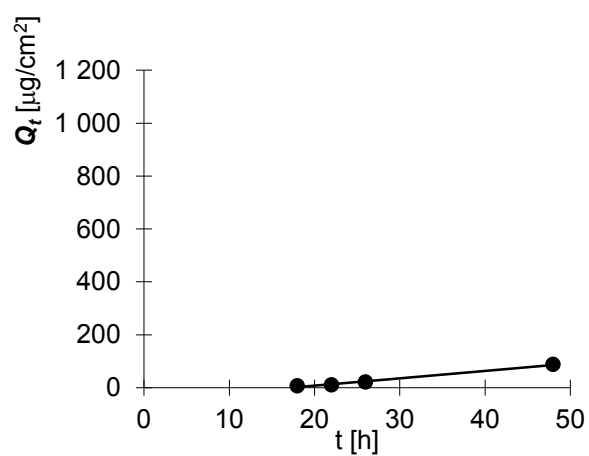
Měření: ExEm: 419/529

Plocha 2

| t | C_{nk} | ΔV_{dop} | C_k | Q_t | Q_t |
|----|----------|------------------|--------|-------|-------|
| 0 | 0,000 | 0,6 | 0,000 | 0,0 | 0,0 |
| 4 | -0,027 | 0,6 | -0,027 | -4,7 | -2,3 |
| 8 | -0,007 | 0,6 | -0,008 | -1,3 | -0,7 |
| 18 | 0,193 | 0,6 | 0,193 | 33,2 | 16,6 |
| 22 | 0,306 | 0,6 | 0,313 | 53,8 | 26,9 |
| 26 | 0,597 | 0,6 | 0,608 | 104,6 | 52,3 |
| 48 | 2,540 | 0 | 2,561 | 440,6 | 220,3 |

| t | $Q_t (exp)$ | $Q_t (teor)$ |
|----|-------------|--------------|
| 18 | 16,6 | 4,7 |
| 22 | 26,9 | 33,0 |
| 26 | 52,3 | 61,3 |
| 48 | 220,3 | 217,1 |

| Parametry regrese | |
|-------------------|--------------|
| Počet bodů | $n = 4$ |
| Flux | $J = 7,1$ |
| Abs. člen | $q = -122,7$ |
| Korelační koef. | $r = 0,9950$ |



| | |
|------------------|------------------------------------|
| V_o | [ml] |
| t | [h] |
| C_{nk} | [mg/100ml] |
| ΔV_{dop} | [ml] |
| C_k | [mg/100ml] |
| Q_t | [μ g] ve V_o |
| Q_t | [μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$ |

$V_o = 17,2$

Subling. membrána

Donor: 1DEX40

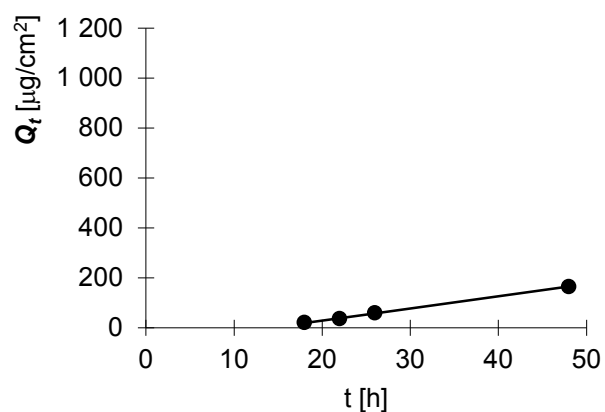
Měření: ExEm: 419/529

Plocha 2

| t | C_{nk} | ΔV_{dop} | C_k | Q_t | Q_t |
|----|----------|------------------|-------|-------|-------|
| 0 | 0,000 | 0,6 | 0,000 | 0,0 | 0,0 |
| 4 | 0,034 | 0,6 | 0,034 | 5,9 | 3,0 |
| 8 | 0,125 | 0,6 | 0,126 | 21,7 | 10,9 |
| 18 | 0,607 | 0,6 | 0,611 | 105,2 | 52,6 |
| 22 | 1,032 | 0,6 | 1,053 | 181,1 | 90,5 |
| 26 | 1,701 | 0,6 | 1,737 | 298,8 | 149,4 |
| 48 | 4,774 | 0 | 4,835 | 831,6 | 415,8 |

| t | Q_t (exp) | Q_t (teor) |
|----|-------------|--------------|
| 18 | 52,6 | 48,6 |
| 22 | 90,5 | 97,6 |
| 26 | 149,4 | 146,5 |
| 48 | 415,8 | 415,6 |

| Parametry regrese | |
|-------------------|--------------|
| Počet bodů | $n = 4$ |
| Flux | $J = 12,2$ |
| Abs. člen | $q = -171,6$ |
| Korelační koef. | $r = 0,9995$ |



| | |
|------------------|------------------------------------|
| V_o | [ml] |
| t | [h] |
| C_{nk} | [mg/100ml] |
| ΔV_{dop} | [ml] |
| C_k | [mg/100ml] |
| Q_t | [μ g] ve V_o |
| Q_t | [μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$ |

$V_o = 16,8$

Subling. membrána

Donor: 1DEX40

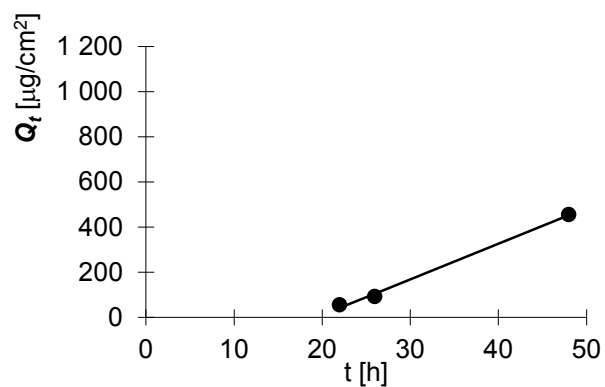
Měření: ExEm: 419/529

Plocha 2

| t | C_{nk} | ΔV_{dop} | C_k | Q_t | Q_t |
|----|----------|------------------|--------|---------|---------|
| 0 | 0,000 | 0,6 | 0,000 | 0,0 | 0,0 |
| 4 | -0,020 | 0,6 | -0,020 | -3,3 | -1,7 |
| 8 | 0,056 | 0,6 | 0,055 | 9,2 | 4,6 |
| 18 | 0,930 | 0,6 | 0,932 | 156,6 | 78,3 |
| 22 | 1,601 | 0,6 | 1,634 | 274,6 | 137,3 |
| 26 | 2,699 | 0,6 | 2,757 | 463,2 | 231,6 |
| 48 | 13,549 | 0 | 13,648 | 2 292,8 | 1 146,4 |

| t | Q_t (exp) | Q_t (teor) |
|----|-------------|--------------|
| 22 | 137,3 | 107,6 |
| 26 | 231,6 | 266,6 |
| 48 | 1146,4 | 1141,0 |

| Parametry regrese | |
|-------------------|------------|
| Počet bodů | n = 3 |
| Flux | J = 39,7 |
| Abs. člen | q = -766,7 |
| Korelační koef. | r = 0,9983 |



| | |
|------------------|------------------------------------|
| V_o | [ml] |
| t | [h] |
| C_{nk} | [mg/100ml] |
| ΔV_{dop} | [ml] |
| C_k | [mg/100ml] |
| Q_t | [μ g] ve V_o |
| Q_t | [μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$ |

$V_o = 15,8$

Subling. membrána

Donor: 1DEX40

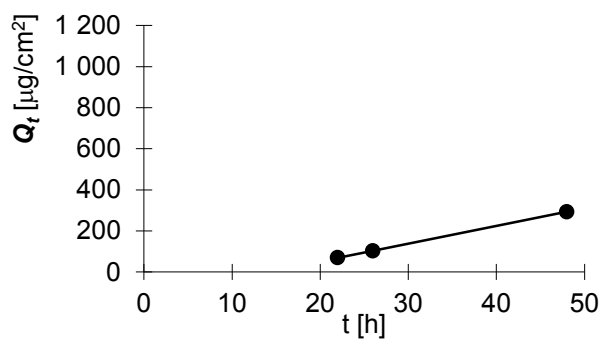
Měření: ExEm: 419/529

Plocha 2

| t | C_{nk} | ΔV_{dop} | C_k | Q_t | Q_t |
|----|----------|------------------|--------|---------|-------|
| 0 | 0,000 | 0,6 | 0,000 | 0,0 | 0,0 |
| 4 | -0,009 | 0,6 | -0,009 | -1,4 | -0,7 |
| 8 | 0,080 | 0,6 | 0,079 | 12,5 | 6,3 |
| 18 | -0,060 | 0,6 | -0,057 | -8,9 | -4,5 |
| 22 | 2,240 | 0,6 | 2,238 | 353,6 | 176,8 |
| 26 | 3,196 | 0,6 | 3,281 | 518,5 | 259,2 |
| 48 | 9,233 | 0 | 9,358 | 1 478,5 | 739,3 |

| t | Q_t (exp) | Q_t (teor) |
|----|-------------|--------------|
| 22 | 176,8 | 174,8 |
| 26 | 259,2 | 261,6 |
| 48 | 739,3 | 738,9 |

| Parametry regrese | |
|-------------------|-------------------|
| Počet bodů | $n = 3$ |
| Flux | $J = 21,7$ |
| Abs. člen | $q = -302,5$ |
| Korelační koef. | $r = 0,999974036$ |



Protokol 36

| | |
|------------------|------------------------------------|
| V_o | [ml] |
| t | [h] |
| C_{nk} | [mg/100ml] |
| ΔV_{dop} | [ml] |
| C_k | [mg/100ml] |
| Q_t | [μ g] ve V_o |
| Q_t | [μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$ |

$V_o = 17$

Subling. membrána

Donor: 1DEX40

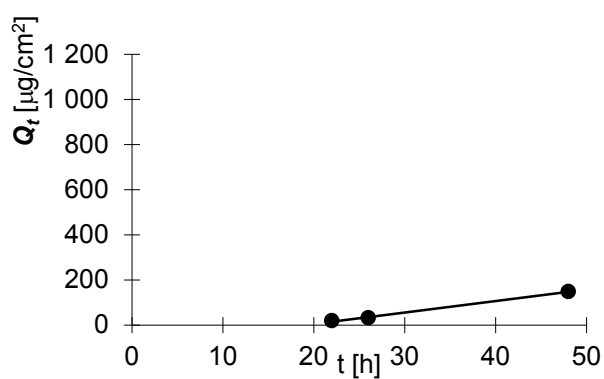
Měření: ExEm: 419/529

Plocha 2

| t | C_{nk} | ΔV_{dop} | C_k | Q_t | Q_t |
|----|----------|------------------|--------|-------|-------|
| 0 | 0,000 | 0,6 | 0,000 | 0,0 | 0,0 |
| 4 | -0,007 | 0,6 | -0,007 | -1,1 | -0,6 |
| 8 | 0,040 | 0,6 | 0,040 | 6,8 | 3,4 |
| 18 | 0,361 | 0,6 | 0,362 | 61,5 | 30,8 |
| 22 | 0,560 | 0,6 | 0,572 | 97,3 | 48,7 |
| 26 | 0,920 | 0,6 | 0,940 | 159,8 | 79,9 |
| 48 | 4,344 | 0 | 4,377 | 744,0 | 372,0 |

| t | Q_t (exp) | Q_t (teor) |
|----|-------------|--------------|
| 22 | 48,7 | 39,6 |
| 26 | 79,9 | 90,5 |
| 48 | 372,0 | 370,4 |

| Parametry regrese | |
|-------------------|-------------------|
| Počet bodů | $n = 3$ |
| Flux | $J = 12,7$ |
| Abs.člen | $q = -240,2$ |
| Korelační koef. | $r = 0,998448614$ |



6 VÝSLEDKY A DISKUZE

6.1 Kalibrační závislosti

Po HPLC stanovení kofeinu ve vzorcích akceptorové fáze v první čtyřhodinové části permeačních pokusů byla kalibrační závislost v proměřeném rozpětí koncentrací (**Tab. 4.1**) přímková. Kalibrační rovnice měla konkrétně tvar

$$A = 691,6 C - 0,66, \quad \text{ve které}$$

A absorbance

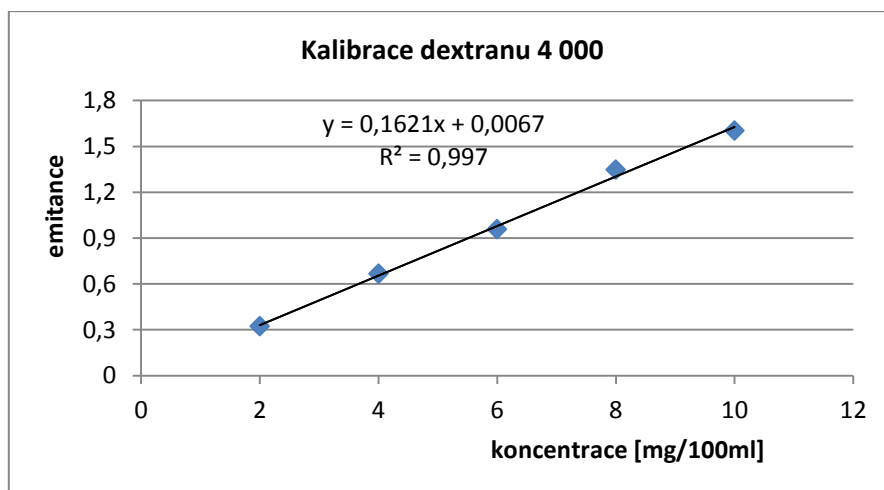
C koncentrace v mg kofeinu/100 ml

Její korelační koeficient činil $R = 0,99995$, proto plně vyhovovala.

Hodnoty získané při kalibraci fluorescenčně značeného dextranu 4000 jsou uvedeny na **Obr. 6.1**. Také z něj je patrné, že lineární regrese nepřinesla žádné problémy. Koeficient determinace $R^2 = 0,997$ byl pro danou koncentrační závislost emitance na koncentraci dextranu 4 000 vyčíslen přístrojovým softwarem. Obdobně tomu bylo i v případě dextranu 20 000 a dextranu 40 000.

V daném rozpětí koncentrací bylo vždy možné využít získanou kalibrační rovnici k navazujícímu stanovování příslušného dextranu v akceptorové fázi z permeačních pokusů, příslušné koeficienty determinace činily konkrétně $R^2 = 0,9991$ pro dextran 20 000 a $R^2 = 0,9991$ pro dextran 40 000.

Obr. 6.1: Kalibrační přímka fluorescein-isothiokyanát dextranu 4 000



6.2 Permeace kofeinu

První důležité výsledky z permeačních pokusů ilustrují grafy na **protokolech 1 až 18**. Na všech jsou permeační profily kofeinu sublingvální membránou. Ze všech je dobře patrné, že vyčíslení hodnot fluxů nečinilo v případě kofeinu problémy.

V grafech na **Obr. 6.3, 6.5 a 6.7** jsou postupně uvedeny všechny hodnoty fluxů kofeinu pro celkem 18 individuálních sublingválních membránových štěpů, celkem z 3 různých jazyků. Variabilita nalezených hodnot fluxů v pokusu byla velmi nízká, jak ukazují nejen zmíněné grafy, ale také celková hodnota průměrného fluxu kofeinu $J = 1370 \text{ } \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$, směrodatná odchylka jednotlivých hodnot fluxů činila $\text{SEM} = 100,8$.

Všechny takto získané výsledky svědčí o velmi dobré kvalitě vypreparovaných sublingválních membrán.

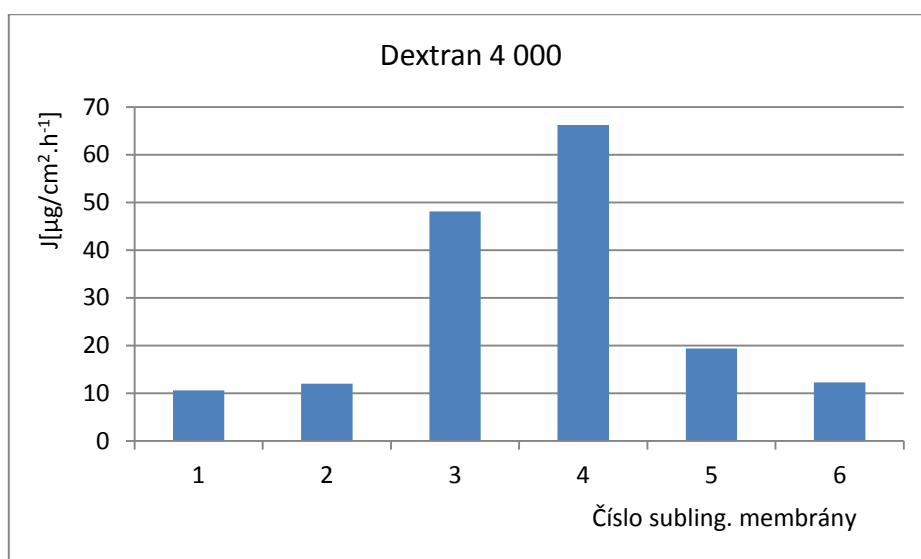
Uvedenou hodnotu J fluxů kofeinu a především jejich variability je možné pro sublingvální membrány se stejným postupem zpracování a uchovávání a stejným donorovým vzorkem považovat za výchozí srovnávací údaj pro další pokusy.

6.3 Permeace dextranů

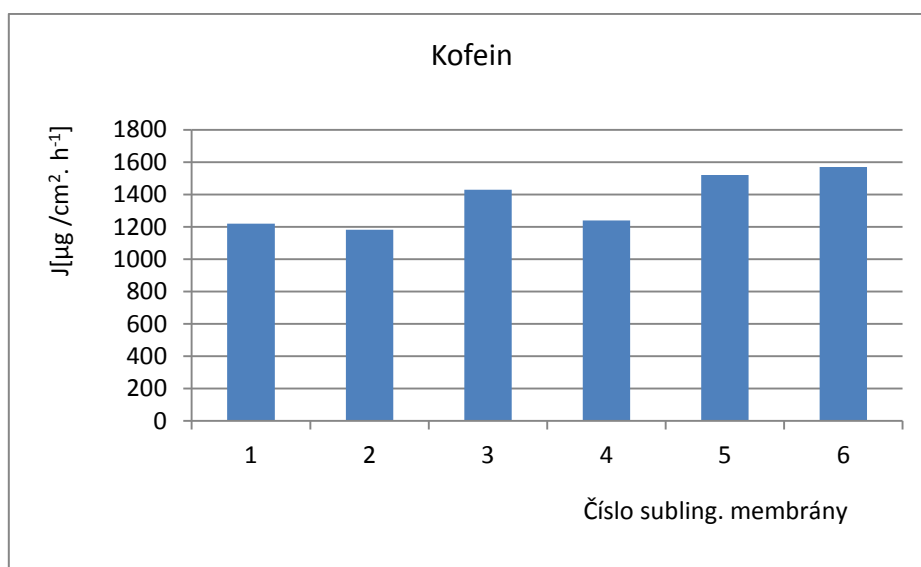
Komplikovanější byla situace při posouzení naměřených časových profilů sublingválního průniku dextranů a návazného vyhodnocování výsledků fluxů. Museli jsme vzít v úvahu, že permeační křivka může mít v zásadě sigmoidní charakter a průnik substance se v jisté fázi zpomaluje a přechází k nějaké limitní hodnotě.

Na začátku permeačního procesu, kdy byl časový profil permeace neurčitý a kolísavý, nebyla závislost mezi časem a koncentrací zpravidla ještě lineární. Údaje z obou těchto úseků byly proto při propočtech hodnot fluxů dextranů vynechávány. Pro výpočty strmosti (pseudo)-stacionárního úseku permeace byla využita pouze přímková část grafu, která flux J dextranu [$\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$] v daném úseku charakterizuje. Při celkovém náhledu na permeační křivku musela být vždy podložena alespoň 3 body, dostatečně od sebe na časové ose vzdálenými.

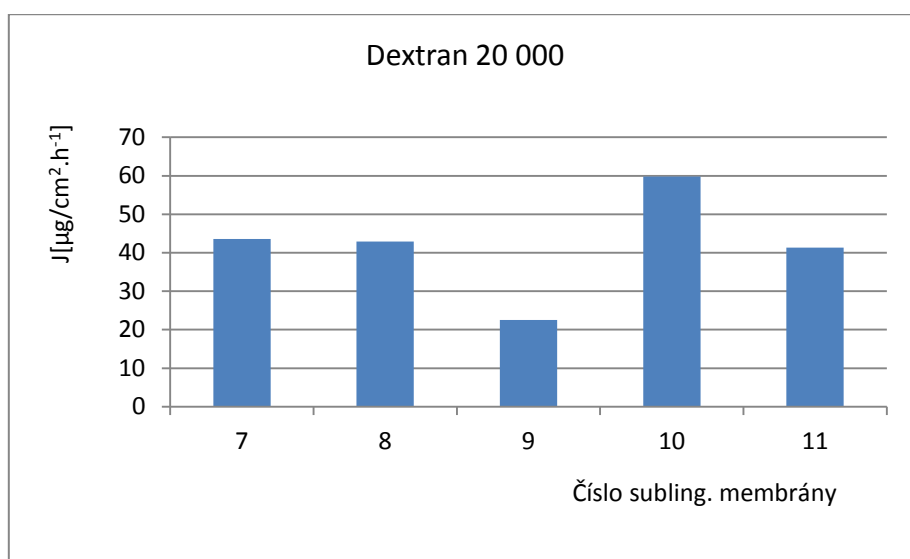
Obr. 6.2 Hodnoty fluxů dextranu 4 000 přes membrány 1-6



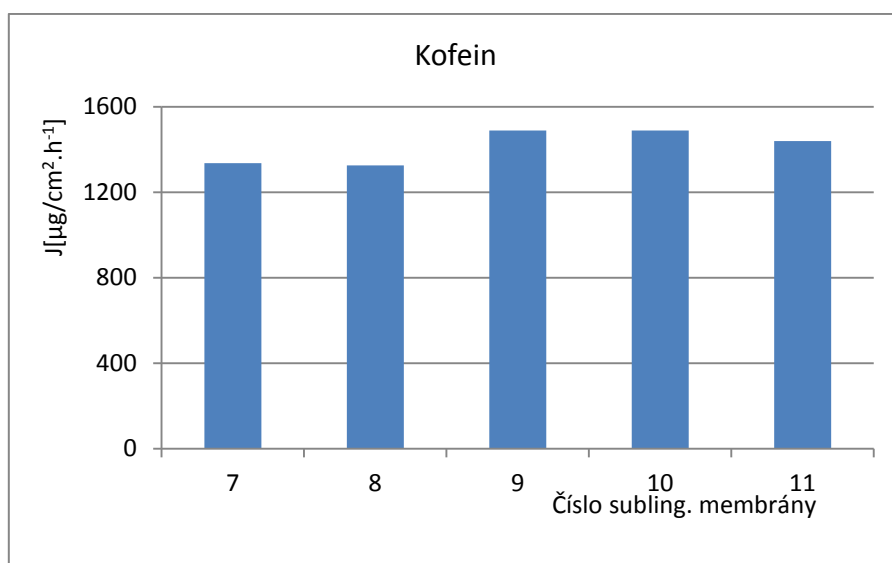
Obr. 6.3: Hodnoty fluxů kofeinu přes membrány 1-6



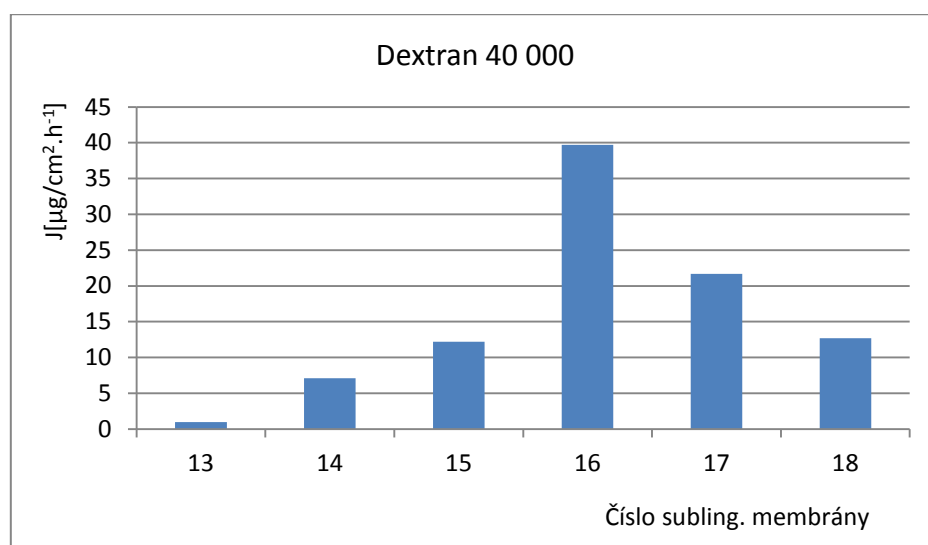
Obr. 6.4 Hodnoty fluxů dextranu 20 000 přes membrány 7-11



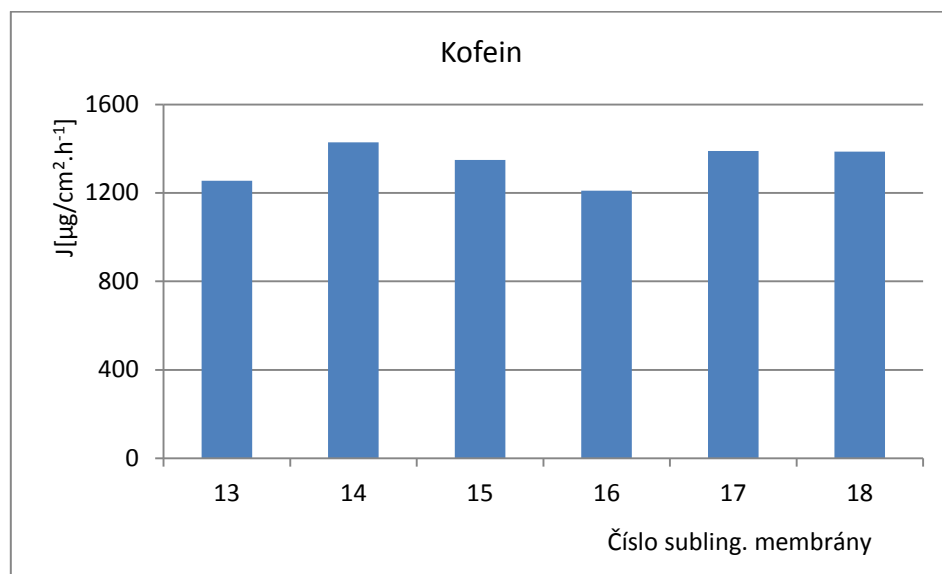
Obr. 6.5 Hodnoty fluxů kofeinu přes membrány 7-11



Obr. 6.6 Hodnoty fluxů dextranu 40 000 (membrány 13-18)

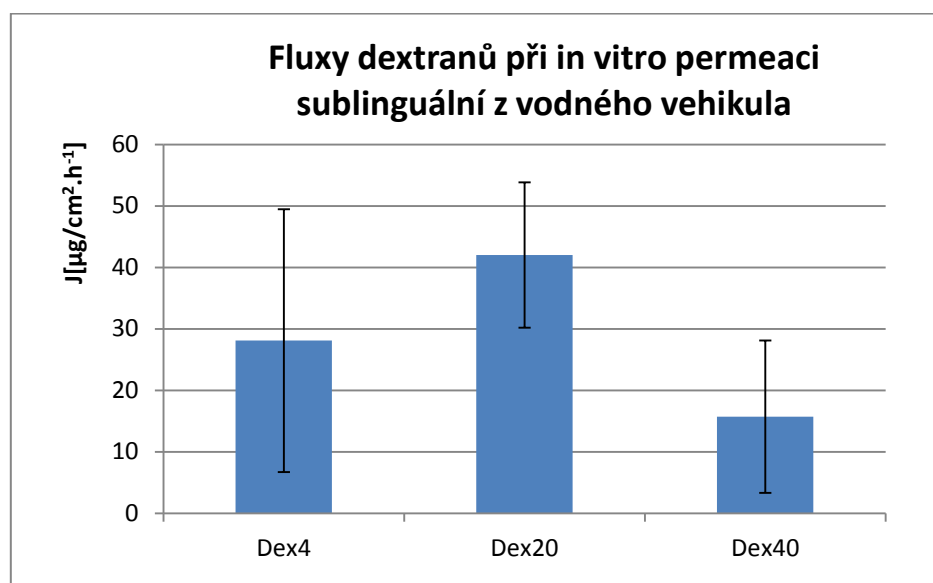


Obr. 6.7 Hodnoty fluxů kofeinu přes membrány 13-18



Ze závěrečného souhrnného grafu fluxů všech 3 dextranů na **Obr. 6.8** je zřejmé, že nejvíce procházel přes sublingvální membránu dextran o molekulové hmotnosti 20 000, pak následoval dextran 4 000 a nejméně prostupoval dextran 40 000. Předpokládali jsme, že pořadí prostupujících dextranů na prvních dvou místech bude opačné, že pořadí fluxů permeujících dextranů bude odrážet jejich molekulové hmotnosti.

Obr. 6.8: Srovnání fluxu dextranu 4000, dextranu 20 000 a dextranu 40 000



Je to zajímavý a zároveň překvapující výsledek. Protože kolísání hodnot fluxů je ovšem v případě dextranů značné, na rozdíl od kofeinu nebudou uvedené výsledky složitěji interpretovány a vyvozovány závěry.

Předpokládáme, že u dextranu o molekulové hmotnosti 4 000 dochází ke shlukování a vytváření agregátů, které neumožňují snadnější prostup, jak bylo očekáváno.

K průkazu pravého důvodu naměřeného jevu by byla potřeba podrobnějšího studia dextranů, jejich vlastností, prostorových struktur a chování v různém prostředí.

Vycházíme-li z dostupných informací o dextranech (viz kap. 3.2.8), nemůžeme důvod překvapivých výsledků ze získaných dat určit.

7 ZÁVĚR

Z teoretické části práce je zřejmá skutečnost, že hlavními výhodami sublingválního podání léčiv je bohatá krevní zásoba sliznice a obejití first-pass metabolismu vstřebanými látkami. Tato aplikační cesta pro dosažení systémové cirkulace léčiv s velkou molekulovou hmotností je pojednána dosud jen málo.

Experimentální část byla proto zaměřena na preparativní přípravu sublingválních membrán a sledování in vitro permeace fluorescenčně značených dextranů o molekulové hmotnosti 4 000, 20 000 a 40 000.

Z experimentu vyplývají tyto závěry

1. Měření transmukozálního fluxu kofeinu přináší velmi reprodukovatelné průměrné hodnoty fluxů kofeinu: $J = 1370 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$; SEM = 100,8.
2. Membrány lze vypreparovat s potřebnou reprodukovatelností.
3. Důležitý je výsledek z hodnocení fluxů dextranů rozdílných molekulových hmotností. Překvapivé je zejména zjištění, že dextran 20 000 pronikal nejrychleji $J = 42,02 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$; SEM = 11,8.
4. Výrazně sníženou permeaci jsme vyhodnotili u dextranu 4 000: $J = 28,11 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$; SEM = 21,4.
5. Potvrdil se předpoklad, že nejmenší flux nalezneme u dextranu 40 000: $J = 15,73 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$; SEM = 12,4.

8 LITERATURA

- ¹ Hoogstraate, J.; Benes, L.; Burgaud, S.; Horriere, F.; Seyler, I. *Oral Transmucosal Drug Delivery* In: Hillery, A. M.; Lloyd, A. W.; Swarbrick, J. Drug Delivery and Targeting for Pharmacists and Pharmaceutical Scientists. Taylor and Francis: New York, USA, 2001, 186-204.
- ² Madhava, N. V. S.; Shakyab, A. K.; Shakyac, P. Oromucosal Drug Delivery Systems. *J. Control. Rel.* **2009**, 140, 2-11.
- ³ Patel, V. F.; Liu, F.; Brown, M. B. Advances in Oral Transmucosal Drug Delivery. *J. Control. Rel.* [online 04/02/2011] **2011**.
- ⁴ Smart, J. D. Lectin-mediated Drug Delivery in the Oral Cavity. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2004**, 56, 481–489.
- ⁵ Slomiany, B. L.; Murty, V. L.; Piotrowski, J.; Slomiany, A. Salivary Mucins in Oral Mucosal Defence. *Gen. Pharmac.* **1996**, 27, 761–771.
- ⁶ Herrera, J. L.; Lyons, M. F.; Johnson, L. F. Saliva: Its Role in Health and Disease. *J. Clin. Gastroenterol.* **1988**, 10, 569–578.
- ⁷ Collins, L. M. C.; Dawes, C. The Surface Area of Adult Human Mouth and Thickness of Salivary Film Covering the Teeth and Oral Mucosa. *J. Dent. Res.* **1987**, 66, 1300–1302.
- ⁸ Salamat-Miller, N.; Chittchang, M.; Johnston, T. P. The Use of Mucoadhesive Polymers in Buccal Drug Delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2005**, 57, 1666–1691.
- ⁹ Ganem-Quintanar, A.; Falson-Rieg, F.; Buri, P. Contribution of Lipid Components to the Permeability Barrier of Oral Mucosa. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **1997**, 44, 107–120.
- ¹⁰ Squier, C. A.; Eady, R. A.; Hopps, R. M. The Permeability of Epidermis Lacking Normal Membrane-coating Granules: An Ultrastructural Tracer Study of Kyrle–Flegel Disease. *J. Invest. Dermatol.*, **1978**, 70, 361–364.
- ¹¹ Dixit, R. P.; Puthle, S. P. Oral Strip Technology: Overview and Future Potential. *J. Control. Rel.* **2009**, 94-107.

-
- ¹² Gandhi, R. B.; Robinson, J. R. Oral Cavity as a Site for Bioadhesive Drug Delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1994**, 13, 43–74.
- ¹³ Harris, D.; Robinson, J. R. Drug Delivery via the Mucous Membranes of the Oral Cavity. *J. Pharm. Sci.* **1992**, 81, 1–10.
- ¹⁴ Oyama, Y.; Yamano, H.; Ohkuma, A.; Ogawara, K.; Higaki, K.; Kimura, T. Carrier-mediated Transport Systems for Glucose in Mucosal Cells of the Human Oral Cavity. *J. Pharm. Sci.* **1999**, 88, 830–834.
- ¹⁵ Campisi, G.; Giannola, L. I.; Florena, A. M.; De Caro, V.; Schumacher, A.; Göttische, T.; Paderni, C.; Wolff, A. Bioavailability in Vivo of Naltrexone Following Transbuccal Administration by an Electronically-controlled Intraoral Device: A trial on Pigs, *J. Control. Rel.* **2010**, 145, 214–220.
- ¹⁶ Pather, S. I.; Rathbone, M. J.; Senel, S. Current Status and the Future of Buccal Drug Delivery Système. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2008**, 5, 531–542.
- ¹⁷ Mashru, R.; Sutariya, V.; Sankalia, M.; Sankalia, J. Transbuccal Delivery of Lamotrigine across Porcine Buccal Mucosa: In Vitro Determination of Routes of Buccal Transport. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* **2005**, 8, 54–62.
- ¹⁸ Deneer, V. H. M.; Drese, G. B.; Roemele, P. E. H.; Verhoef, J. C.; Lie-A-Huen, L.; Kingma, J. H.; Brouwers, J. R. B. J.; Junginger, H. E. Buccal Transport of Flecainide and Sotalol: Effect of a Bile Salt and Ionization State. *Int. J. Pharm.* **2002**, 241, 127–134.
- ¹⁹ Nielsen, H. M.; Rassing, M. R. Nicotine Permeability across the Buccal TR146 Cell Culture Model and Porcine Buccal Mucosa in Vitro: Effect of pH and Concentration. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2002**, 16, 151–157.
- ²⁰ Bredenberg, S.; Duberg, M.; Lennernäs, Bo; Lennernäs, H.; Pettersson, A.; Westerberg, M.; Nyström, Ch. In Vitro and in Vivo Evaluation of a New Sublingual Tablet System for Rapid Oromucosal Absorption Using Fentanyl Citrate as the Active Substance. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2003**, 20, 327–334.
- ²¹ De Caro, V.; Giandalia, G.; Siragusa, M. G.; Paderni, C.; Campisi, G.; Giannola, L. I. Evaluation of Galantamine Transbuccal Absorption by Reconstituted Human Oral

Epithelium and Porcine Tissue as Buccal Mucosa Models: Part I. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2008**, 70, 869–873.

²² Lindenberga, M.; Kooppb, S.; Dressman, J. B. Classification of Orally Administered Drugs on the World Health Organization Model list of Essential Medicines According to the Biopharmaceutics Classification System. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2004**, 58, 265-278.

²³ Lobenberga, R.; Amidon, G. L. Modern Bioavailability, Bioequivalence and Biopharmaceutics Classification Systém: New Scientific Approaches to International Regulatory Sandards. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2000**, 50, 3-12.

²⁴ Alur, H. H.; Beal, J. D.; Pather, S. I.; Mitra, A. K.; Johnston, T. P. Evaluation of a Novel, Natural Oligosaccharide Gum as a Sustained-release and Mucoadhesive Component of Calcitonin Buccal Tablets. *J. Pharm. Sci.* **1999**, 88, 1313–1319.

²⁵ Lopez, C. R.; Portero, A.; Vila-Jato, J. L.; Alonso, M. J. Design and Evaluation of Chitosan/ethylcellulose Mucoadhesive Bilayered Devices for Buccal Drug Delivery. *J. Control. Rel.* **1998**, 55, 143–152.

²⁶ Mehvar, R. Dextrans for Targeted and Sustained Delivery of Therapeutic and Imaging Agents. *J. Control. Rel.* **2000**, 69, 1-25.

²⁷ Stenekes, R. J. H.; Tlasma, H.; Hennink, W. E. Formation of Dextran Hydrogels by Crystallization. *Biomaterials.* **2000**, 13, 1891-1898.

²⁸ Gil, E. C.; Colarte, A. I.; Ghzaoui, A. E. A Sugar Cane Native Dextran as an Innovative Functional Excipient for the Development of Pharmaceutical Tablets. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2008**, 68, 319-329.